国外名校名著

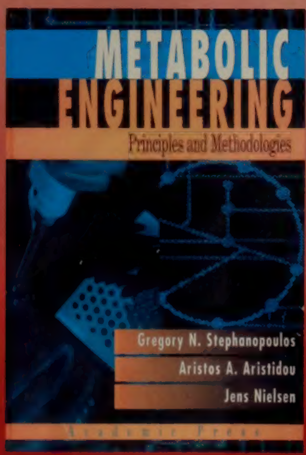
代谢工程

——原理与方法

METABOLIC ENGINEERING

——Principles and Methodologies

[美] Gregory N.Stephanopoulos
[美] Aristos A.Aristidou 著
[丹麦] Jens Nielsen
赵学明　白冬梅　等译



化学工业出版社

[illegible]

国外名校名著

代 谢 工 程

——原理与方法

METABOLIC ENGINEERING

—— Principles and Methodologies

[美] Gregory N. Stephanopoulos

[美] Aristos A. Aristidou 著

[丹麦] Jens Nielsen

赵学明 白冬梅 等译

化 学 工 业 出 版 社

北 京

2003

中科院植物所图书馆
S0003509
58.1761
616

国外名校名著

代谢工程

——原理与方法

METABOLIC ENGINEERING

—— Principles and Methodologies

［美］Gregory N. Stephanopoulos
［美］Aristos A. Aristidou 著
［丹麦］Jens Nielsen
赵学明 白冬梅 等译

化学工业出版社
·北 京·

27831

（京）新登字 039 号

图书在版编目（CIP）数据

代谢工程：原理与方法/[美]斯蒂芬那保罗（Stephanopoulos G.N.），[美]阿里斯泰道(Aristidou A.A.)，[丹麦] 尼尔森（Nielsen J.）著；赵学明，白冬梅等译．—北京：化学工业出版社，2003.12
书名原文：Metabolic Engineering—Principles and Methodologies
ISBN 7-5025-4568-9

Ⅰ. 代… Ⅱ. ①斯…②阿…③尼…④赵…⑤白… Ⅲ. 代谢-生物工程 Ⅳ.Q591

中国版本图书馆 CIP 数据核字（2003）第 093746 号

METABOLIC ENGINEERING—Principles and Methodologies/
by Gregory N.Stephanopoulos, Aristos A.Aristidou, Jens Nielsen
ISBN 0-12-666260-6
Copyright © 1998 by Academic Press.
Translation Copyright @ 2003 by Chemical Industry Press. All rights reserved.

本书中文简体字版由 Academic Press 授权化学工业出版社独家出版发行。
未经出版者许可，不得以任何方式复制或抄袭本书的任何部分。

北京市版权局著作权合同登记号：01-2001-4512

国外名校名著

代谢工程

——原理与方法

METABOLIC ENGINEERING

—— Principles and Methodologies

[美] Gregory N.Stephanopoulos
[美] Aristos A.Aristidou 著
[丹麦] Jens Nielsen

赵学明 白冬梅 等译

责任编辑：骆文敏
文字编辑：丁建华
责任校对：郑 捷
封面设计：郑小红

*

化学工业出版社出版发行
（北京市朝阳区惠新里 3 号 邮政编码 100029）
发行电话：（010）64982530
http://www.cip.com.cn

*

新华书店北京发行所经销
化学工业出版社印刷厂印刷
三河市东柳装订厂装订
开本 787 毫米×1092 毫米 1/16 印张 28 字数 685 千字
2003 年 12 月第 1 版 2003 年 12 月北京第 1 次印刷
ISBN 7-5025-4568-9/G·1237
定 价：39.00 元

版权所有 违者必究

该书如有缺页、倒页、脱页者，本社发行部负责退换

原　　序

代谢工程是关于代谢途径的分析与修饰的科学。该领域出现于过去 10 年，并由来自应用分子生物学和反应工程的技术所驱动，目前正变成生物学、生物化学工程、细胞生物学和应用微生物学等许多学科研究活动的一个焦点。虽然途径操作的概念以前已讨论过，但代谢工程的远景以独特的方式作为一个明确定义的学科是 1991 年由 Bailey 首先提出的，之后很快就被生物工程师和生命科学家所接受，他们看到捕获由基因组学研究所产生的序列和其它信息的潜力方面所存在的机遇。

1993 年，我们首先在 MIT（美国麻省理工学院）开设的一门课中对我们的学生传授表达了代谢工程的基本概念及其引起的兴奋与激动。这种试验在 1995 年、1997 年又重复进行几次。在那时，一个明确的教学大纲和一套教学笔记作为这些奉献的结果出现了。在丹麦工业大学（DTU）有一个类似的发展：在本科生和研究生的生物化学工程课程中代谢工程已成为一个中心主题。1996 年首次正式提供了关于代谢工程的标准的一学期课程。对代谢工程增长着的兴趣及分享该课程教学材料的需求导致我们确定写这本书。在这样做的过程中，我们试图对酶反应途径的分析构建一个定量生物化学的框架。在这种意义上，本书反映了焦点从设备向单个细胞的变换，焦点集中到细胞生物化学功能的阐明与操作上。因此，这本教科书可向研究生和高年级本科生提供一门代谢工程课程以补充生物化学工程领域目前开出的课程。

本书初稿曾用于 MIT 和 DTU 的代谢工程教学，也曾用于 MIT 的暑期代谢工程课程。本书的内容可覆盖一个学期而没有先修特定课程的要求，当然先修一些生物化学入门性的课程是有帮助的。该学期的第一个四分之一从生物化学书中指定了一些阅读材料以补充本书的第一部分。有助于理解基本概念的习题集将在下面列出的网页上定期公布。虽然本书的焦点是代谢，但途径分析的概念是广泛的，因而对其它类型的反应系列一般都是可以应用的，这包括蛋白质表达、翻译后修饰或信号转导途径等过程的分析。

写一本仍在形成中的学科方面的书是一种挑战，接受这种挑战也就增加了责任。为此，我们设定的目标是：详细说明对于途径设计和分析处于中心位置的核心原理，同时用从最近研究中得出的方法加以补充。我们期待着这些方法进一步发展，并希望这本书在“催化”这种活动中起作用。实现这些方法的软件可在相关的网页上找到。此外，本书中的数学复杂性已经保持到一个最低的水平，并在可能的地方提供了背景材料，以辅助尽可能少地采用数学。我们知道这个任务的挑战性以及满足读者范围广泛的各个层面的困难。我们鼓励读者继续对本书的评审，而不要被任何暂时的困难所阻挡。

我们要感谢很多人，其中一些对本书做出过直接的贡献，一些在该任务的计划及执行中提供了间接的帮助。首先，我们对我们学生的无穷的干劲及高度的创新性表示感谢，特别是：Maria Klapa 对代谢通量分析深入细致的核查；Troy Simpson 的研究提供了复杂途径分析的基础。同样，我们感谢 Martin Bastian Pedersen 对很多图的绘制；Christian Muller，Susanne Sloth Larsen，Birgitte Karsbol 和 Kristen Nielsen 在最后确定初稿中提供的帮助。我们感谢我们的同事们，特别是：Tony Sinskey 对代谢工程的无限广阔可能性的热情；Sue

Harrison 和 Eduardo Agosin 所作的最具建设性的评论。最后，我们感谢我们的合作者和朋友，特别是：Barry Buckland，Bernhard Palsson，John Villadsen，Maish Yarmush 和 D. Ramkrishna，对他们的洞察力和对许多重要问题坚定不移的支持。

Gregory N. Stephanopoulos
Aristos A. Aristidou
Jens Nielsen

中译本序

五年以前，我们的教科书“代谢工程——原理和方法”出版了。从那时起，我们的著作成功地用于国际上若干大学的教学，而且两年以前该书已译成日文出版发行。对这部著作的兴趣很可能是由于工业生物技术的迅速发展。在工业生物技术领域，通过对特定细胞工厂引入定向基因修饰而进行的新的生物过程的开发正被越来越多的世界一流发酵公司所应用。随着中国生物技术的迅速发展及中国大学教育标准的提高，中国已使自己处于工业生物技术领域一个主要的国际参赛者的位置。在这种情况下，出版一本中文代谢工程的教科书是非常及时的。我代表本书的共同作者 Gregory N. Stephanopoulos 教授和 Aristos A. Aristidou 博士谨对选用我们的著作译成中文深表感激。我们感谢本书译者们所做的贡献及付出的辛勤劳动。我们希望本书中译本对中国的新一代代谢工程工作者能起鼓舞和激励作用。

Jens Nielsen

2003 年 9 月 16 日

译 序

人们利用微生物生产有用产品已有很长的历史，但自然界的微生物只能生产微量产品而且所需的生产条件很难在工业条件下实现。因此需要对这些微生物菌种进行改进才能满足工业生产的需要。五十多年来，人们用随机诱变及筛选的方法进行菌种改进，已在抗生素、氨基酸、有机酸等工业生产上取得很大进展。代价是随机性大，需要漫长的时间，而且生产能力低，往往在经济上竞争不过化学路线，因而远远不能满足工业生产的需要。原因是我们对细胞的生理特性理解不深，不能定向施加必要的遗传变化和（或）环境条件来改进细胞的性能。20 世纪 80 年代发展起来的重组技术引起了人们通过引入赋有所希望性质的基因进行菌种定向改进的兴趣；具有上百年历史的化学工程技术，在对从分子水平到整个生产过程乃至生态环境复杂系统分析与集成中，积累了丰富的理论知识和实践经验。由于发展的需要及支撑技术提供的可能性，于是诞生了一门新学科——代谢工程。

代谢工程是应用分子生物学与反应工程技术不断发展融合的结果，是对细胞（包括微生物、植物、动物乃至人体细胞）内代谢途径网络系统分析的基础上进行定向地有目的地改变，以更好地理解和利用细胞代谢进行化学转化、能量转导和超分子组装。代谢工程可在细胞与分子水平上认识和改造细胞过程，其不仅在解释细胞生理特性上具有重要的科学意义，而且其潜在的应用跨越了生物技术的全部领域，主要包括：(1) 异源蛋白的生产；(2) 扩大底物利用范围；(3) 生产原来不存在的新物质；(4) 对环境有害物质的降解；(5) 提高菌体对环境的适应能力；(6) 阻断或降低副产物的生成；(7) 代谢产品生产速率和生产能力的提高；(8) 植物代谢工程；(9) 动物代谢工程；（10）人体和组织代谢工程——新药发现及人类疾病诊断和基因治疗。

1991 年美国加州理工学院和麻省理工学院化学工程系教授 Bailey 和 Stephanopoulos 等在同一期《Science》上分别发表了："Toward a Science of Metabolic Engineering" 和 "Network Rigidity and Metabolic Engineering in Metabolite Overproduction" 两篇重要文章，标志着代谢工程新学科的诞生。1993 年 Cameron 等发表了 "Cellular and Metabolic Engineering" 的长篇综述文章，举出了 100 多个细胞和代谢工程的实例。1995 年 Bailey 又发表了 "Chemical Engineering of Cellular Processes" 的长篇文章，详细讨论了生物网络工程及代谢工程。1996 年召开了第一次国际代谢工程会议。此后，国际代谢工程会议定期两年举行一次。1998 年本书作者 Stephanopoulos G.，Aristidou A. 及 Nielsen J. 出版了国际上第一部代谢工程教科书。1999 年以 Bailey 教授为主编的《Metabolic Engineering》刊物正式出版。此后，代谢工程研究及工业实践发展迅速，大量研究论文及综述文章不断发表，这可从本书两位作者近两年的综述文章看到。Stephanopoulos 教授的文章包括："After a decade of progress, an expanded role for metabolic engineering"（Adv. Biochem. Eng., 2001），"How to make a superoor cell"（Science, 2001），"Metabolic engineering as an integrating plantform for strain development"（Cur. Opi. Biotech., 2001），"Metabolic engineering: a new frontier of chemical reaction engineering"（Chem.Eng.Sci., 2002），"Metabolic engineering by genome shuffling"（Nature Biotech., 2002）。Nielsen 教授的文章："Metabolic engineer-

ing" (Appl. Microbiol. Biotechnol., 2001),"An expanded role for microbial physiology in metabolic engineering and functional genomics: moving toward systems biology" (FEMS Yeast Research, 2002),"A functional genomics approach using metabolomics and in silico pathway analysis" (Biotechnol. Bioeng., 2002)。他们的文章总结了代谢工程的研究进展，进一步阐明了后基因组时代代谢工程的任务及研究方法。

代谢工程诞生仅十余年，引起了全世界学术界、企业界及政府部门的广泛重视。1995年底，美国科学技术政策办公室下属的生物技术分委员会发布了"21世纪的生物技术——新展望"报告，确定了若干优先研究领域，代谢工程为其中之一，并成立了由国家科技专家组成的"代谢工程工作组"(MEWG)，专门协调美国各部委以促进代谢工程的研究。该工作组通过组织美国八个部委（基金委、能源部、农业部、国防部、国家卫生研究院、国家标准局、国家环保局、国家航空宇航局）共同资助代谢工程研究。从1998～2003年已连续资助五年代谢工程的科学基础研究，资助金额已达2800万美元。同时，由于代谢工程潜在的应用价值，许多公司投巨资与学校及研究机构（如DuPont公司与Genencor，Merck公司与MIT）合作进行代谢工程研究改进菌种。欧盟多次在其"框架计划"中专门设立"细胞工厂"研究项目，大力资助代谢工程研究。由于生物科学技术的飞速发展、多学科的交叉、政府的高额资助及企业的积极参与，使得代谢工程研究在科学基础及应用方面均取得巨大进展，集中体现在如下两篇评论文章：BBA以"用途径工程进行化学品的商业生产"为题介绍了代谢途径工程与发酵技术的集成在芳香化合物、有机酸（琥珀酸、乳酸、维生素C)、醇（乙醇、甘油、1,3-丙二醇）和次级代谢物（类异戊二烯、聚酮、非核糖体肽）等生产中的成功例子［BBA，1543，434～455（2000)］；《Science》以"如何制造性能优良的细胞"为题介绍了用大肠杆菌制造靛蓝、合成β-胡萝卜素的金色水稻、用链霉菌制造优良的聚酮分子、通过导入一个编码红细胞葡萄糖传递蛋白的人类基因（glutl）把专性硅藻菌转化为一个异养菌，从而改变了其代谢途径而能在没光的情况下代谢葡萄糖。所有这些均是在对细胞代谢网络及调控机理深入研究的基础上的重要科学发现，具有划时代的科学意义及工业和医用价值。

本书作者所在学校（美国麻省理工学院和丹麦工业大学）是国际上从事代谢工程研究最早最活跃的单位，Stephanopoulos和Nielsen两位教授在代谢工程及相关领域发表科学论文都在200篇以上，他们都因在代谢工程领域的开拓性贡献以及在将生物学成功结合到化学工程研究中的领导作用而分别当选为美国工程科学院院士和丹麦工程科学院院士。他们都分别担任过国际代谢工程会议的主席。在Bailey教授两年前病逝后，他们分别担任"代谢工程"刊物的主编与副主编。两位教授在生物工程教学中不断进行学科交叉的创新与改革，并分别获得优秀教学奖。本书不仅是代谢工程科学发展及大量实例的总结，而且对代谢工程的原理及方法首次进行了科学的阐述，为代谢工程乃至复杂生物系统的研究奠定了坚实的基础。相信本书中译本的出版将会大大促进我国代谢工程的教学、科研以及生物技术产业的发展。

从1999年开始，本书英文版就作为我校"生物反应与代谢工程"科研组的主要参考书，并先后作为硕士、博士研究生学位课的双语教学用书。2000年在新加坡-MIT研讨会上，译者向本书作者Stephanopoulos教授请教了代谢工程教学中的一些问题。他对双语教学的做法表示肯定，同时表示如果出版中译本，他们可以提供全书所有插图（电子版)。为了促进我国代谢工程研究的发展，也为了加深对"代谢工程"一书的理解，2003年3月我们邀请本书作者Nielsen教授来校讲学一周。除了当面讨论外，我们就翻译中的一些问题经常通过

电子邮件进行交流。我们非常感谢 Nielsen 教授和 Aristidou 博士所提供的所有电子版插图，非常感谢 Nielsen 教授多次通过电子邮件对所提问题的及时回答与解释。

参加本书翻译工作的有天津大学化工学院生物工程系的有关教师、博士后及参加双语教学的博士研究生，他们是：白冬梅、赵学明（第 1、2 章）；娄凯、白冬梅、赵学明（第 3、4 章）；李文钊、班睿、赵学明（第 5 章）；李文钊、赵学明（第 6 章）；王昌禄、李文钊、赵学明（第 7、8 章）；王国海、赵学明（第 9、10 章）；陈涛、赵学明（第 11、12 章）；沈玉宝、孔庆学、赵学明（第 13 章）；马红武、白冬梅、赵学明（第 14 章）；专业词汇（陈洵、马平生）；索引（白冬梅）；符号说明（白冬梅）。白冬梅博士还承担了全书图表的翻译工作、有关物质名词和菌种名称的翻译或核对工作、全书格式调整及符号统一工作等。

由于原著是国际上第一本代谢工程书籍，译者对其中一些内容缺乏科研及教学的实践经验，再加上时间仓促，错误之处在所难免，如蒙读者指出，我们将不胜感谢。

赵学明

2003 年 9 月 16 日于天津大学化工学院

目　　录

符号说明

第1章　代谢工程的实质 …… 1

1.1　代谢工程的重要性 …… 5

1.2　本书的概要 …… 8

参考文献 …… 11

第2章　细胞代谢综述 …… 12

2.1　细胞代谢概述 …… 12

2.2　运输过程 …… 15

2.2.1　被动运输 …… 15

2.2.2　促进扩散 …… 17

2.2.3　主动运输 …… 19

2.3　供能反应 …… 21

2.3.1　糖酵解 …… 21

2.3.2　发酵途径 …… 26

2.3.3　TCA 循环和氧化磷酸化 …… 28

2.3.4　回补途径 …… 30

2.3.5　脂类、有机酸和氨基酸的分解代谢 …… 32

2.4　生物合成反应 …… 33

2.4.1　氨基酸的生物合成 …… 33

2.4.2　核酸、脂肪酸和其它结构单元的生物合成 …… 36

2.5　聚合反应 …… 38

2.6　生长能学 …… 41

参考文献 …… 44

第3章　细胞反应的综合模型 …… 48

3.1　细胞反应的化学计量学 …… 48

3.2　反应速率 …… 52

3.3　动态质量平衡 …… 54

3.4　产率系数与线性速率方程 …… 59

参考文献 …… 66

第4章　物质平衡与数据一致性 …… 67

4.1　黑箱模型 …… 67

4.2　元素平衡方程式 …… 68

4.3　热平衡 …… 73

4.4　超定系统的分析——过失测量误差的识别 …… 75

参考文献 …… 83

第 5 章　代谢途径的调控 …… 85
5.1　酶活性的调控 …… 86
5.1.1　酶动力学概述 …… 87
5.1.2　简单可逆抑制系统 …… 90
5.1.3　不可逆抑制 …… 94
5.1.4　别构酶 …… 95
5.2　酶浓度调节 …… 98
5.2.1　转录起始的控制 …… 98
5.2.2　翻译的控制 …… 101
5.3　总体调控：在完整细胞水平上的调控 …… 102
5.4　代谢网络的调控 …… 107
5.4.1　分支点分类 …… 110
5.4.2　耦合反应与总体流通代谢物的作用 …… 112
参考文献 …… 114
第 6 章　途径操作实例——代谢工程实践 …… 116
6.1　产品得率及生产能力的提高 …… 116
6.1.1　乙醇 …… 117
6.1.2　氨基酸 …… 121
6.1.3　溶剂 …… 126
6.2　扩大底物范围 …… 128
6.2.1　戊糖代谢生产乙醇的代谢工程 …… 128
6.2.2　纤维素-半纤维素解聚作用 …… 132
6.2.3　乳糖和乳清利用 …… 132
6.2.4　蔗糖利用 …… 134
6.2.5　降解淀粉的微生物 …… 134
6.3　扩展产物范围，增加新产品 …… 135
6.3.1　抗生素 …… 135
6.3.2　聚酮化合物 …… 136
6.3.3　维生素 …… 139
6.3.4　生物聚合物 …… 140
6.3.5　生物色素 …… 145
6.3.6　氢 …… 146
6.3.7　戊糖：木糖醇 …… 147
6.4　细胞性能的改进 …… 148
6.4.1　氮代谢的改造 …… 148
6.4.2　提高氧的利用 …… 148
6.4.3　过度代谢的防止 …… 149
6.4.4　底物吸收的改变 …… 151
6.4.5　遗传稳定性的维持 …… 152
6.5　异生物的降解 …… 152

6.5.1 多氯联苯（PCBs） …… 153
6.5.2 苯、甲苯和对二甲苯混合物（BTX） …… 154
参考文献 …… 156
第 7 章 代谢途径合成 …… 166
7.1 代谢途径合成算法 …… 167
7.2 算法综述 …… 173
7.3 实例研究——赖氨酸生物合成 …… 176
7.3.1 草酰乙酸的作用 …… 179
7.3.2 其它替代途径 …… 179
7.3.3 关于最高得率的限制 …… 179
7.4 算法的讨论 …… 180
参考文献 …… 181
第 8 章 代谢通量分析 …… 182
8.1 理论 …… 184
8.2 超定系统 …… 196
8.3 不定系统-线性规划 …… 201
8.4 敏感性分析 …… 204
参考文献 …… 206
第 9 章 利用同位素标记实验测定代谢通量的方法 …… 207
9.1 根据标记富集度分数直接确定通量 …… 208
9.1.1 根据瞬时强度测量确定代谢通量 …… 208
9.1.2 代谢稳态和同位素稳态实验 …… 209
9.2 涉及同位素标记代谢物完全列出的应用 …… 214
9.2.1 来自标记丙酮酸的 TCA 循环同位素标记代谢物的分布 …… 216
9.2.2 来自标记乙酸的 TCA 循环同位素标记代谢物的分布 …… 221
9.2.3 实验数据整理 …… 222
9.3 碳平衡 …… 232
9.3.1 直接碳平衡 …… 232
9.3.2 原子作图矩阵的应用 …… 237
参考文献 …… 240
第 10 章 代谢通量分析的应用 …… 241
10.1 由谷氨酸细菌生产氨基酸 …… 242
10.1.1 谷氨酸菌的生物化学与调节 …… 242
10.1.2 理论得率的计算 …… 245
10.1.3 *C.glutamicum* 菌中赖氨酸生物合成网络的代谢通量分析 …… 250
10.1.4 *C.glutamicum* 特定缺失突变株的代谢通量分析 …… 257
10.2 哺乳动物细胞培养中的代谢通量 …… 261
10.2.1 胞内通量的确定 …… 261
10.2.2 通过 ^{13}C 标记研究证实通量估计 …… 265
10.2.3 通量分析在细胞培养基设计中的应用 …… 268

第 5 章　代谢途径的调控 …… 85
5.1　酶活性的调控 …… 86
5.1.1　酶动力学概述 …… 87
5.1.2　简单可逆抑制系统 …… 90
5.1.3　不可逆抑制 …… 94
5.1.4　别构酶 …… 95
5.2　酶浓度调节 …… 98
5.2.1　转录起始的控制 …… 98
5.2.2　翻译的控制 …… 101
5.3　总体调控：在完整细胞水平上的调控 …… 102
5.4　代谢网络的调控 …… 107
5.4.1　分支点分类 …… 110
5.4.2　耦合反应与总体流通代谢物的作用 …… 112
参考文献 …… 114
第 6 章　途径操作实例——代谢工程实践 …… 116
6.1　产品得率及生产能力的提高 …… 116
6.1.1　乙醇 …… 117
6.1.2　氨基酸 …… 121
6.1.3　溶剂 …… 126
6.2　扩大底物范围 …… 128
6.2.1　戊糖代谢生产乙醇的代谢工程 …… 128
6.2.2　纤维素-半纤维素解聚作用 …… 132
6.2.3　乳糖和乳清利用 …… 132
6.2.4　蔗糖利用 …… 134
6.2.5　降解淀粉的微生物 …… 134
6.3　扩展产物范围，增加新产品 …… 135
6.3.1　抗生素 …… 135
6.3.2　聚酮化合物 …… 136
6.3.3　维生素 …… 139
6.3.4　生物聚合物 …… 140
6.3.5　生物色素 …… 145
6.3.6　氢 …… 146
6.3.7　戊糖：木糖醇 …… 147
6.4　细胞性能的改进 …… 148
6.4.1　氮代谢的改造 …… 148
6.4.2　提高氧的利用 …… 148
6.4.3　过度代谢的防止 …… 149
6.4.4　底物吸收的改变 …… 151
6.4.5　遗传稳定性的维持 …… 152
6.5　异生物的降解 …… 152

6.5.1 多氯联苯（PCBs） …… 153
6.5.2 苯、甲苯和对二甲苯混合物（BTX） …… 154
参考文献…… 156
第 7 章 代谢途径合成…… 166
7.1 代谢途径合成算法 …… 167
7.2 算法综述 …… 173
7.3 实例研究——赖氨酸生物合成 …… 176
7.3.1 草酰乙酸的作用 …… 179
7.3.2 其它替代途径 …… 179
7.3.3 关于最高得率的限制 …… 179
7.4 算法的讨论 …… 180
参考文献…… 181
第 8 章 代谢通量分析…… 182
8.1 理论 …… 184
8.2 超定系统 …… 196
8.3 不定系统-线性规划…… 201
8.4 敏感性分析 …… 204
参考文献…… 206
第 9 章 利用同位素标记实验测定代谢通量的方法…… 207
9.1 根据标记富集度分数直接确定通量 …… 208
9.1.1 根据瞬时强度测量确定代谢通量 …… 208
9.1.2 代谢稳态和同位素稳态实验 …… 209
9.2 涉及同位素标记代谢物完全列出的应用 …… 214
9.2.1 来自标记丙酮酸的 TCA 循环同位素标记代谢物的分布 …… 216
9.2.2 来自标记乙酸的 TCA 循环同位素标记代谢物的分布 …… 221
9.2.3 实验数据整理 …… 222
9.3 碳平衡 …… 232
9.3.1 直接碳平衡 …… 232
9.3.2 原子作图矩阵的应用 …… 237
参考文献…… 240
第 10 章 代谢通量分析的应用 …… 241
10.1 由谷氨酸细菌生产氨基酸…… 242
10.1.1 谷氨酸菌的生物化学与调节…… 242
10.1.2 理论得率的计算…… 245
10.1.3 *C.glutamicum* 菌中赖氨酸生物合成网络的代谢通量分析 …… 250
10.1.4 *C.glutamicum* 特定缺失突变株的代谢通量分析 …… 257
10.2 哺乳动物细胞培养中的代谢通量…… 261
10.2.1 胞内通量的确定…… 261
10.2.2 通过^{13}C 标记研究证实通量估计 …… 265
10.2.3 通量分析在细胞培养基设计中的应用…… 268

参考文献…………………………………………………………………………………………… 268
第 11 章　代谢控制分析 …………………………………………………………………… 270
11.1　代谢控制分析的基础……………………………………………………………………… 271
11.1.1　控制系数和加和定理………………………………………………………………… 272
11.1.2　弹性系数和连接定理………………………………………………………………… 274
11.1.3　MCA 理论的一般化 ………………………………………………………………… 276
11.2　通量控制系数的确定……………………………………………………………………… 277
11.2.1　确定通量控制系数的直接法………………………………………………………… 279
11.2.2　确定通量控制系数的间接法………………………………………………………… 282
11.2.3　瞬态代谢物测量的应用……………………………………………………………… 284
11.2.4　动力学模型…………………………………………………………………………… 286
11.3　线性途径的 MCA ………………………………………………………………………… 286
11.4　分支途径的 MCA ………………………………………………………………………… 291
11.5　大偏差理论………………………………………………………………………………… 299
11.5.1　未分支的网络………………………………………………………………………… 299
11.5.2　分支网络……………………………………………………………………………… 304
11.5.3　对营养物浓度和外部效应物变化的响应…………………………………………… 307
11.5.4　讨论…………………………………………………………………………………… 307
参考文献…………………………………………………………………………………………… 308
第 12 章　代谢网络的结构分析 …………………………………………………………… 311
12.1　在单一分支点处通量分布的控制………………………………………………………… 313
12.2　反应分组…………………………………………………………………………………… 316
12.2.1　组通量控制系数……………………………………………………………………… 316
12.2.2　独立途径的识别……………………………………………………………………… 317
12.3　实例研究——芳香族氨基酸的生物合成途径…………………………………………… 322
12.3.1　*S.cerevisiae* 中芳香族氨基酸生物合成模型 ……………………………………… 322
12.3.2　独立途径的确定……………………………………………………………………… 326
12.3.3　连接代谢物的识别和组通量确定…………………………………………………… 328
参考文献…………………………………………………………………………………………… 338
第 13 章　代谢网络的通量分析 …………………………………………………………… 339
13.1　组控制系数与单个控制系数之间的关系（自下而上法）……………………………… 339
13.2　由通量测量确定组控制系数（自上而下法）…………………………………………… 341
13.2.1　从三个扰动确定 gFCCs ……………………………………………………………… 341
13.2.2　从已表征的扰动确定 gFCCs ………………………………………………………… 343
13.2.3　gCCCs 的确定 ………………………………………………………………………… 344
13.2.4　扰动的可观察性……………………………………………………………………… 344
13.3　实例研究…………………………………………………………………………………… 345
13.3.1　组控制系数的解析确定（自下而上法）…………………………………………… 345
13.3.2　gFCCs 实验确定的模拟（自上而下法） …………………………………………… 350
13.4　交叉代谢物反应组控制分析的扩展……………………………………………………… 352

13.4.1 扰动常数…………………………………………………………………………………… 352
13.4.2 多分支点上重叠反应组的分析……………………………………………………………… 352
13.4.3 实例研究…………………………………………………………………………………… 354
13.5 通量扩增的优化………………………………………………………………………………… 355
13.5.1 优化算法的推导…………………………………………………………………………… 355
13.5.2 实例研究…………………………………………………………………………………… 357
13.6 一致性检验与实验证实………………………………………………………………………… 359
13.6.1 利用多次扰动发展一致性检验……………………………………………………………… 360
13.6.2 对预苯酸分支点的应用…………………………………………………………………… 363
13.6.3 测量误差的影响…………………………………………………………………………… 364
参考文献…………………………………………………………………………………………… 365
第 14 章 细胞过程热力学 ……………………………………………………………………… 366
14.1 热力学原理：综述……………………………………………………………………………… 366
14.2 热力学可行性…………………………………………………………………………………… 371
14.2.1 算法………………………………………………………………………………………… 372
14.2.2 利用基团贡献法确定 $\Delta G^{0'}$ …………………………………………………………… 377
14.3 非平衡热力学…………………………………………………………………………………… 384
14.4 热动力学在代谢控制分析中的应用……………………………………………………………… 396
参考文献…………………………………………………………………………………………… 400
专业词汇…………………………………………………………………………………………… 402
索引……………………………………………………………………………………………… 410

符号说明

下面是本书中常用的一些符号。这里所用的单位为最典型的用法，在某些情况下可能有其它的单位。

英文符号

a_{cell}	细胞的比表面积[$m^2 \cdot g^{-1}$(干重)]
$\mathbf{a}$	含有式（8.26）中的目标函数中的单个变量权重的行向量
A_i	第 i 个反应的亲和力（$kJ \cdot mol^{-1}$）
c	浓度（$mmol \cdot L^{-1}$）
c_i	第 i 个化合物的浓度（$mmol \cdot L^{-1}$）
c_i^f	加入到生物反应器中的第 i 个化合物的浓度（$mmol \cdot L^{-1}$）
$C_i^{J_j}$	第 i 个酶对第 j 个稳态通量 J_j 的通量控制系数
$^*C_i^{J_j}$	第 i 个组对稳态通量 J_j 的组通量控制系数
$C_i^{X_j}$	第 i 个酶对第 j 个代谢物浓度的浓度控制系数
$^*C_i^{X_j}$	第 i 个组对第 j 个代谢物浓度的组浓度控制系数
$\mathbf{C}^J$	包含通量控制系数的矩阵
$\mathbf{C}^X$	包含浓度控制系数的矩阵
d_{men}	细胞质膜的厚度（m）
D	稀释速率（h^{-1}）
D_{mem}	膜扩散的扩散系数（$m^2 \cdot s^{-1}$）
D_i^J	式（11.84）给出的偏差指数
E_i	第 i 个酶的活性（或浓度）
$\mathbf{E}$	元素组成矩阵或包含弹性系数的矩阵
$\mathbf{E}_c$	未测量化合物的元素组成矩阵
$\mathbf{E}_m$	已测量化合物的元素组成矩阵
f	式（11.87）所给的通量扩增因子
f_{ij}	通量 j 与通量 i 的比值[由式（11.50）给出]
F	进入生物反应器的体积流速（$L \cdot h^{-1}$）
F_{out}	流出生物反应器的体积流速（$L \cdot h^{-1}$）
$\mathbf{F}$	方差-协方差矩阵
g_{ij}	在第 j 个反应中的第 i 个胞内代谢物的化学计量系数
G	吉布斯函数（$kJ \cdot mol^{-1}$）
ΔG	吉布斯自由能的变化（$kJ \cdot mol^{-1}$）
ΔG^0	在所有反应物和产物均为标准态时的吉布斯自由能变化（$kJ \cdot mol^{-1}$）
$\mathbf{G}$	含有胞内代谢物化学计量系数矩阵
$\mathbf{G}_c$	含有通量未被测量的反应中，胞内代谢物的化学计量系数矩阵
$\mathbf{G}_m$	含有通量已被测量的反应中，胞内代谢物的化学计量系数矩阵
$\mathbf{G}_{ex}$	含有正、反两个方向所有反应的化学计量系数的代谢模型的化学计量系数矩阵
h	由方程式（4.29）给出的检验函数

$h_{s,i}$　第 i 个底物的碳含量（$C\text{-}mol \cdot mol^{-1}$）
$h_{p,i}$　第 i 个代谢产物的碳含量（$C\text{-}mol \cdot mol^{-1}$）
H　焓函数（$kJ \cdot mol^{-1}$）
H_j　式（14.29）给出的热力学函数
$\mathbf{I}$　单位矩阵，即，矩阵所有对角线元素为 1，其它元素为 0
j　式（14.46）给出的流比
J_i　通过分支路径 i 的稳态通量［$mmol \cdot g^{-1}$（干重）$\cdot h^{-1}$］
$\mathbf{J}$　稳态通量向量［$mmol \cdot g^{-1}$（干重）$\cdot h^{-1}$］
$\mathbf{J}_{dep}$　非独立通量向量［$mmol \cdot g^{-1}$（干重）$\cdot h^{-1}$］
$\mathbf{J}_{in}$　独立通量向量［$mmol \cdot g^{-1}$（干重）$\cdot h^{-1}$］
k　速率常数
K　分析中所考虑的胞内代谢物的数目
K_{eq}　平衡常数
K_{par}　在液膜和培养基之间的分配系数（无因次的）
K_m　Micheaelis-Menten 常数（或饱和常数）（$mmol \cdot L^{-1}$）
K_i　抑制常数（$mmol \cdot L^{-1}$）
$\mathbf{K}$　符合式（12.7）的核心矩阵
L_{ij}　表观系数
m_{ATP}　维持代谢的 ATP 需要
M　分析中所考虑的代谢产物的数目
N　分析中所考虑的底物的数目
p　影响反应速率的参数［在式（11.5）中用到］
P　渗透系数（$m \cdot s^{-1}$）
P_i　第 i 个代谢产物
$\mathbf{P}$　残差的方差-协方差矩阵或含有参数弹性系数的矩阵
q　耦合度
Q　分析中所考虑的大分子库的数目
Q_{heat}　与菌体生长相关的热量生成［$kJ \cdot C\text{-}mol^{-1}$（菌体）］
r　比速率［$mmol \cdot g^{-1}$（干重）$\cdot h^{-1}$］
r_{ATP}　ATP 的生成速率［$mmol \cdot g^{-1}$（干重）$\cdot h^{-1}$］
r_i　式（11.86）所给的活性扩增因子
$r_{macro,i}$　第 i 个大分子库的比生成速率［$g \cdot g^{-1}$（干重）$\cdot h^{-1}$］
$r_{met,i}$　第 i 个胞内代谢物的比生成速率［$mmol \cdot g^{-1}$（干重）$\cdot h^{-1}$］
r_p　产物比生成速率［$mmol \cdot g^{-1}$（干重）$\cdot h^{-1}$］
r_s　底物比消耗速率［$mmol \cdot g^{-1}$（干重）$\cdot h^{-1}$］
r_{tran}　穿过细胞膜的比运输速率［$mmol \cdot g^{-1}$（干重）$\cdot h^{-1}$］
$\mathbf{r}_c$　非测量的比速率向量［$mmol \cdot g^{-1}$（干重）$\cdot h^{-1}$］
$\mathbf{r}_m$　测量的比速率向量［$mmol \cdot g^{-1}$（干重）$\cdot h^{-1}$］
$\mathbf{r}_{macro}$　含有大分子的比生成速率向量［$g \cdot g^{-1}$（干重）$\cdot h^{-1}$］
$\mathbf{r}_{met}$　含有胞内代谢物的比生成速率向量［$mmol \cdot g^{-1}$（干重）$\cdot h^{-1}$］
$\mathbf{r}_p$　含有代谢产物的比生成速率向量［$mmol \cdot g^{-1}$（干重）$\cdot h^{-1}$］
$\mathbf{r}_s$　含有底物的比消耗速率向量［$mmol \cdot g^{-1}$（干重）$\cdot h^{-1}$］
R　气体常数［$=0.008314 kJ \cdot (K \cdot mol)^{-1}$］
R_i　式（13.40）给出的活性扩增参数

$R^{J_j}_{X_i}$	式（11.7）给出的响应系数
$\mathbf{R}$	式（4.17）给出的冗余矩阵
$\mathbf{R}_r$	含有 **R** 的独立行的缩减冗余矩阵
S	熵函数［$kJ\cdot(K\cdot mol)^{-1}$］
S_i	第 i 个底物
T	温度（K）
$\mathbf{T}$	含有式（8.12）确定的化学计量系数的矩阵
v_j	第 j 个关联的比速率［$mmol\cdot g^{-1}$（干重）$\cdot h^{-1}$］
$^*v^i$	第 i 个反应组的总比速率（活性）［$mmol\cdot g^{-1}$（干重）$\cdot h^{-1}$］
v_{max}	酶催化反应的最大比速率（$mmol\cdot h^{-1}$）
$\mathbf{v}$	反应速率向量（或胞内稳态通量）［$mmol\cdot g^{-1}$（干重）$\cdot h^{-1}$］
$\mathbf{v}_c$	未测量的反应速率向量［$mmol\cdot g^{-1}$（干重）$\cdot h^{-1}$］
$\mathbf{v}_m$	测量的反应速率向量［$mmol\cdot g^{-1}$（干重）$\cdot h^{-1}$］
V	生物反应器的体积（L）
x	菌体浓度（$g\cdot L^{-1}$）
$X_{macro,i}$	第 i 个大分子库的浓度［g（干重）$\cdot h^{-1}$］
$X_{met,i}$	第 i 个胞内代谢物的浓度
Y_{ij}	得率系数［$mmol(j)\cdot g^{-1}$（干重）$\cdot h^{-1}$］
Y^{true}_{ij}	真实得率系数［$mmol(j)\cdot g^{-1}$（干重）$\cdot h^{-1}$］
Y_{xATP}	细胞生长的 ATP 需要［mmol（ATP）$\cdot g^{-1}$（干重）$\cdot h^{-1}$］
$Y_{xATP,growth}$	细胞合成的 ATP 需要［mmol（ATP）$\cdot g^{-1}$（干重）$\cdot h^{-1}$］
$Y_{xATP,lysis}$	由于细胞自溶浪费的细胞生长所需的 ATP［mmol（ATP）$\cdot g^{-1}$（干重）$\cdot h^{-1}$］
$Y_{xATP,leak}$	由于泄漏和无效循环的 ATP 需要［mmol（ATP）$\cdot g^{-1}$（干重）$\cdot h^{-1}$］
Z	式（14.48）给出的表观化学计量关系

希腊字母

α_{ji}	第 j 个反应中的第 i 个底物的化学计量系数
$\mathbf{A}$	含有底物化学计量系数的矩阵
β_{ji}	第 j 个反应中的第 i 个代谢产物的化学计量系数
$\mathbf{B}$	包含代谢产物化学计量系数的矩阵
χ	式（14.49）给出的力比
χ_i	式（11.78）中的参数
δ	测量误差向量
ε	式（4.20）给出的残差向量
$\varepsilon^i_{X_j}$	式（11.11）给出的弹性系数
ϕ^j_i	式（11.103）给出的代谢物扩增因子
$\mathbf{\Phi}_i$	耗散函数（$kJ\cdot mol^{-1}$）
γ_{ji}	第 j 个反应中的第 i 个大分子库的化学计量系数
$\mathbf{\Gamma}$	包含大分子库的化学计量系数矩阵
η_{th}	热力学效率
κ	一般化还原度
μ	比生长速率（h^{-1}）
μ_i	第 i 个化合物的化学势（$kJ\cdot mol^{-1}$）
μ^0_i	在参考状态下的第 i 个化合物的化学势（$kJ\cdot mol^{-1}$）
$\pi^i_{p_l}$	式（11.19）给出的参数弹性系数
τ	特征时间（h）

第 1 章　代谢工程的实质

为了赋予微生物所希望的性质，而对其代谢途径进行操作，这种方法很早以前人们就开始研究和应用。这种方法在氨基酸、抗生素、溶剂和维生素等领域的成功应用，在很大程度上依赖于化学诱变剂和创造性的筛选技术的使用来识别符合某种目的的优良菌株。尽管这些方法已被广泛认可，并已取得很大成功，但是对于这些突变菌株的遗传和代谢却缺乏表征，而且诱变仍然是一个随机的过程，该过程中科学是用艺术原理来补充增强的。

用于脱氧核糖核酸（DNA）重组的分子生物技术的发展为代谢途径操作提供了新的方法。通过基因工程可以对代谢途径中特定的酶反应进行精确的修饰，从而进行遗传背景意义明确的菌种构建。在 DNA 重组技术的可行性被确证后不久，就出现了许多术语来描述这种技术在途径定向修饰方面的潜在应用，如：分子育种（Kellogg et al，1981）、体外进化（Timmis et al，1988）、（微生物或代谢）途径工程（MacQuity，1988；Tong et al，1991）、细胞工程（Nerem，1991）和代谢工程（Stephanopoulos and Vallino，1991；Baley，1991）。尽管每一个具体的定义因作者的不同而不同，但在代谢工程总的目标和方法方面都表达了类似的含义。在这里，我们把代谢工程定义为：利用 DNA 重组技术对特定的生化反应进行修饰或引入新的反应以定向改进产物的生成或细胞的性质。上述定义的基本特征是：定为目标要修饰的、或打算要新引入的特定生化反应的专一性。一旦这样的反应目标被确定，那么就要应用已建立的分子生物学技术对相应的基因或酶进行扩增、抑制或缺失、转移、或解除调控。为了达到上述目的，广义的 DNA 重组技术已被广泛应用到各个步骤中。

尽管定向性从某种意义上来讲是所有菌种改进工作的固有特性，但是代谢工程与随机诱变相比，其工作焦点致力于定向性，以致其在目标酶的选择、实验设计以及数据分析等方面都起着重要的作用。另一方面，细胞的定向改进不应解释为合理的途径设计与修饰，因此在这个意义上说，代谢工程与随机诱变是完全不同的。实际上，通过随机诱变而得到的性能优良的菌株能够作为关于途径结构与控制方面重要信息的来源，这可经由反向代谢工程获取。

像其它传统的工程领域一样，代谢工程也包括两个明确的步骤：即分析与合成。因为代谢工程是随着 DNA 重组而出现的可行技术，所以最初代谢工程几乎都集中于这个领域的合成方面：如在各种宿主细胞中新基因的表达、内源酶的扩增、基因的缺失或酶活性的调节、转录的或酶的解除调控等。因此，代谢工程在很大程度上曾是应用分子生物学的技术体现，而很少带有工程方面的内容。生物过程所考虑的事情并不具备代谢工程的条件。在代谢工程的分析方面可找到更多重要的工程内容：如何确定决定生理状态的重要参数？如何利用这些信息来阐明代谢网络的控制结构并为达到某一目的而提出合理的靶标进行修饰？为了设计下一轮的途径修饰直至达到目标，人们如何进一步评价这些基因或酶修饰的确实的生物化学影响？若不是用通常的特定目标筛选过程，人们能够提出一个合理的过程来确定最有希望的目标进行代谢操作吗？这些都是代谢工程的分析方面应强调重视的问题。

在合成方面，代谢工程的另一个创新方面是集中于整体的代谢途径而不是单个的反应。因此，代谢工程检验的是完整的生物化学反应网络，包括其途径合成和热力学可行性问题，以及途径的通量分布及其控制。因此，我们正在目睹着从单个的酶反应向相互作用的生化反

应系统这一范例的变换。从这个意义上讲，代谢网络的含义极其重要，因为通过考虑反应的整个系统而不是相互独立的一个个反应，从而就可增强对代谢和细胞功能透彻理解的能力。通过代谢工程，人们已把注意力变换到整个系统，而不是其组成零件。关于这一点，代谢工程正在利用众多还原论者的研究而得来的技术和信息寻求合成和设计。转而，通过对整体系统行为的观察，可更好地指导更加合理的分解和分析。

尽管代谢和细胞生理学提供了分析反应途径的主要内容，但应该指出：通量确定与调控的结果具有广泛的适用性。因此，除了对通过代谢途径中的物质和能量通量分布进行分析外，代谢工程的概念同样可用于分析诸如信号转导途径中的信息通量。由于信号转导途径及其通量还没被精确定义，因此本书集中在代谢途径的应用上。然而，一旦信息途径的概念被具体化，我们预期这里所介绍的方法和工具将会在信号转导途径相互作用的研究中以及在外部刺激控制基因表达的复杂机理的解释中得到很好的应用。

或许，代谢工程最重要的贡献在于强调在胞内条件下代谢通量及其调控。当然，代谢通量这个概念本身并不是新的。大约在 30 年前，代谢通量及其控制就已引起了虽然是一小部分但思维超前的生物化学研究组的注意。虽然传统的生物化学家并不广泛接受这些思想，但正是这一部分人的工作使得代谢控制的思想日渐成熟，并被严密定义。代谢工程，最初被认为是特定的途径操作，但很快就成为工程师们施展分析技能的天然场所，工程师们看到了通过利用通用的代谢控制分析平台技术在这些过程中引入严密分析的机会。代谢工程的实质是：将通量及其控制进行量化的方法与分子生物学技术结合起来，用以执行所建议的基因修饰任务。当反复利用代谢工程方法时，它就为在很广范围内系统改进细胞的性质提供了一种强有力的方法。

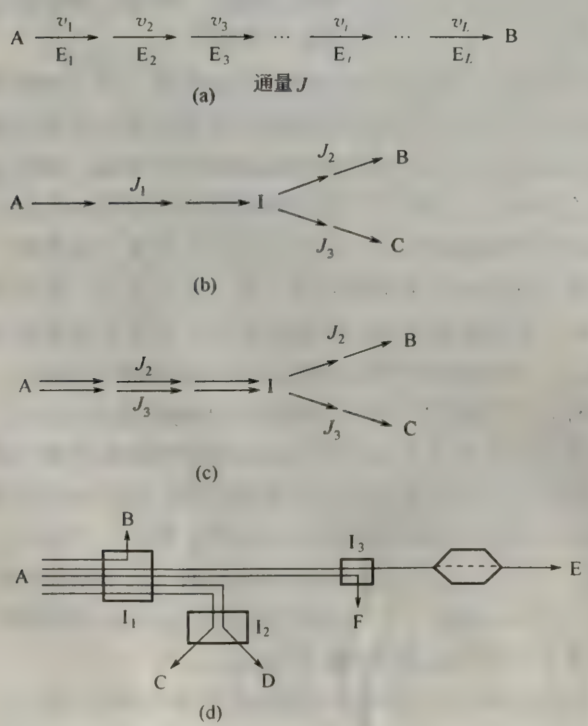


图 1.1 简单途径举例

通量是细胞生理学的一个基本决定因素，也是代谢途径中最重要的参数。在图 1.1（a）所示的线性途径中，通量 J 等于稳态条件下各个单个反应的速率。显然，当中间代谢物的浓度调整到能使所有反应速率都相等时（$v_1=v_2=\cdots v_i=\cdots v_L$），就达到稳态了。在瞬态过程中，各个反应速率是不相等的，途径的通量是变化的和不清楚的（通常是到底物消耗或产物生成改变速率的时候）。在图 1.1（b）所示的分支途径中，在中间代谢物 I 处出现分支途径，每个分支途径有相应的通量，在稳态时 $J_1=J_2+J_3$。每一个分支途径上的通量等于相应的分支途径上的单个反应速率。如图 1.1（c）所示，通常把通量 J_1 认为是线性途径中通量 J_2 和 J_3 的叠加。用这种方法可将如图 1.1（d）所示的复杂网络分解为一些线性途径，每一个途径有其各自的通量。需要指出的是，在图 1.1

所示的所有途径中，达到稳态的一个必须条件就是：初始的和最终的反应速率（或分别等价于初始代谢物与最终代谢物 A、B、C 等的浓度）必须恒定，这个条件可通过在连续培养反应器（通常指恒化反应器）中保持恒定的胞外代谢物浓度而实现。

由于代谢途径及其通量是代谢工程的核心，因此，对它们的定义与含义稍加详述。我们把代谢途径定义为：一连串可以进行的并可观测的生物化学反应步骤，这些反应步骤是以指定的一组输入和输出代谢物所连接。途径通量定义为：输入代谢物反应生成输出代谢物的速率。在这里需要特别指出可行性和可观测性的重要性。首先，创造无意义的反应步骤而催化这些在细胞中根本不存在的反应的酶，这样的工作是没有价值的。类似地，列举那些通过实验观测不到的底物与产物之间的可能反应步骤也是没有多大意义的。代谢图谱的多样性和复杂性这一点非常重要，这是过去 50 年生物化学领域中开拓性研究所构建的。尽管在特定的输入和输出代谢物之间常常存在多于一种生物反应序列，但如果这些反应序列的通量不能独立确定，那么包含这样的反应序列就没提供任何附加的信息。如果这些反应序列可以合并成少数几个通量可观测的途径，会更好些。在图 1.1（d）中，如果导致生成代谢物 E 的每一个分支途径的通量不能通过实验方法或其它方法确定，那么两个分支途径必须合并成一个单个途径（如虚线所示）。很明显，应鼓励进行可获取更多信息的测量，例如那些能够区别前两个分支途径的方法，因为其提高了对生化途径的分辨能力。胞内代谢通量的确定称为代谢通量分析（MFA），其在代谢工程中处于中心地位。

在代谢途径及其通量的框架中，代谢工程的一个基本目标就是阐明代谢通量控制的因素和机理。对于通量控制的深入理解为代谢途径进行合理修饰提供了基础。对代谢通量及其控制进行系统的研究包括三个步骤。第一，开发能够观测尽可能多的代谢途径及测定其通量的方法。为了这个目的，可在测定胞外代谢物浓度的基础上，以简单的物质平衡为出发点。图 1.1（d）代谢网络中代谢物 A～F 的测定，可以确定所指示的 5 个通量，但并不是代谢物 F 之前的分支途径的通量。取决于标记前体物 A 的用法，如果对由特定分支形成的代谢物 F 进行不同的标记，那么就该方法可提供 F 之前的分支点处的通量比的信息。这是几种能被用来提供关于分支途径的一些附加信息的技术之一，在这本书中我们将用很大篇幅来讨论这些技术。有必要强调的是，代谢途径的通量并不等同于途径中一种酶或多种酶的催化活性。实际上，除了表明在胞外分析条件下相应的酶存在并有活性之外，酶分析并不能提供有关途径实际通量的信息。在代谢研究中，这些酶分析包括通常被误解为包含类似大小的代谢通量，由此普遍下结论当然是不正确的。

第二步是向生物反应网络引入一个精确的扰动并在系统达到新的稳态之后确定途径的通量。由于所有的代谢控制研究都会很快地集中于某一特定的代谢分支点上，所以很容易考虑图 1.2 所示的分支途径的通量控制。一般来说，为了研究这个分支点，需要引入 3 个扰动，即在三个相应的支路中分别引入一个扰动。理想的扰动包括使用一个恒化器，在达到稳态条件后，其中一个酶的活性被突然的扰动（例如通过使用诱导启动子）。这种实验安排最适合于微生物或细胞培养系统。在其它系统中如植物或体内器官功能体系中就需要不同的实验配置。其它容易实施的扰动措施，例如施加一个底物脉冲或切换到不同的碳源，都可以获得丰富的信息。虽然也可以使用其它能对相应分支途径通量有可觉察影响的扰动，但扰动的目标应指向分支点附近的酶。最后应注意的是：一种扰动能提供不只一个分支点的信息，这对于减少用来阐明一个实际代谢网络控制结构所需的实验数目是非常有用的。

通量控制确定中的第三步即最后一步是通量扰动结果的分析。很显然，利用图 1.2 中 3

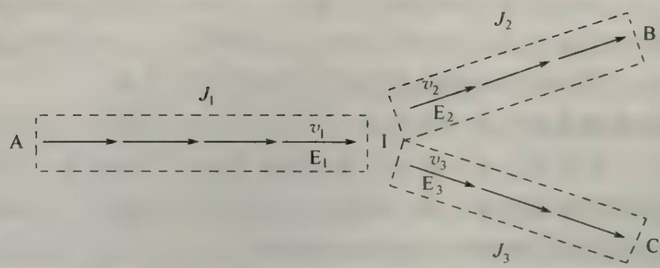


图 1.2　单个反应分组的分支途径

个分支途径的每一个通量扰动，都可以探查特定分支点处的柔韧性。例如，如果通量 J_1 的一个大的扰动并没有引起其它两个支路通量在大小或分布方面的明显变化，那么很显然，这个节点对于上游的扰动来说就是一个刚性节点。在这种情况下，想通过改变上游的酶活性来改变下游的通量是无效的。其它两个分支途径可以采用类似的方法进行分析。了解一个通量的扰动是如何通过分支点乃至整个网络的传播是非常重要的，这种通量的扰动可以是反应速率的改变（诱导），或者是在整个代谢途径中导入一个较大的通量（底物脉冲），或可用其它方法来实现。在分支之一开始的扰动会通过整个网络的代谢物而传播。例如，通量 J_1 的增加可能会引起也可能不会引起分支点处代谢物 I 的浓度的显著变化，这反过来也反映了该通量对那个代谢物水平所施加的控制程度。另一方面，如果通量 J_2 和 J_3 被严格调控或在特定的稳态下其受代谢物 I 浓度的影响很微弱，那么，即使 I 改变了，对通量 J_2 和 J_3 也没什么影响。这是在分析分支点以及代谢网络通量控制时可能呈现的很多情况之一。阐明通量控制的重要性在于每一种通量控制的结构将支配一个不同的策略以进行通量扩增或通量分配比的改变。

代谢工程的一个主要目标就是对代谢通量控制的理解，其中所做的一个很重要的努力就是 20 世纪 70 年代发展起来的代谢控制分析（MCA）（Kacser and Burns，1973；Heinrich and Rapoport，1974），它是通过途径中酶的活性、代谢物、效应物和其它参数所施加的通量控制程度进行定量表述。本书将对代谢控制分析进行全面介绍，而且我们还将主要通过从上至下的代谢控制分析和反应分组入手将基本理论扩展到复杂的代谢网络。如图 1.2 所示，这种方法的主要原则就是对围绕分支点代谢物（例如 I）的单个体反应进行分组，然后通过引入组控制系数来描述由这些反应组所施加的控制程度。这种方法成功的关键限制通过共同分支点代谢物 I 的所有联系，消除反应组之间的交互作用。因此，应当指出的是：反应分组和从上至下 MCA 的成功应用可以有助于将 MCA 的主要决定因素定位于明确定义的反应组内，该反应组所含的酶的数目比典型的反应系统所需要涉及的酶的数目比要少很多。此外，这种焦点集中的研究方法是合理分析的结果，而不是主要考虑单个反应影响而忽视代谢网络系统特征的权宜应付的方法。

通量控制的关键参数确定以后，人们需要实施这些变化从而最有效地达到预定目标。可用多种方法来实现这个目标。虽然人们首先会想到基因修饰，但也不应忽略与基因改变同等重要的生物反应器的控制。例如，如果图 1.2 中代谢物 B 是目标产物，而且分支点 I 对于生成代谢物 C 的通量变化是柔性的，那么通过消除 C 分支途径上的第一个酶（E_3），就可以获得 B 的高产菌了。这种基因改变会形成 C 的营养缺陷型，为了最优维持细胞的生长速率和产物合成速率之间的平衡，必须通过控制向培养基中加入代谢物 C。另一个方法就是保持

E_3 的较小活性，以使代谢物 C 能够由细胞本身合成，因而可以消除为了加入适量代谢物 C 而采用的控制操作。在实施通量控制的策略中，无论采用哪种路线，为获得最佳的结果，都应将基因修饰和环境条件改变结合起来使用。

众所周知，代谢工程是多学科交叉领域（Cameron and Tong，1993）。生物化学已提供了基本的代谢图谱以及关于生化反应机理及其计量学、动力学和调控的大量信息。另外，代谢控制分析的整个领域在得到工程领域认可之前，是起源并扎根于生物化学的。遗传学和分子生物学提供了构建完善的遗传背景的工具，这是通量控制中重要的一步。此外，这两门学科是构建高产菌株过程中进行遗传改变的有力工具。人们应当记住在代谢工程诞生过程中重组 DNA 技术的重要作用。实际上，作为一项可行的技术，DNA 重组技术为代谢工程的定义和发展提供了原动力。细胞生理学提供了细胞代谢功能更为综合的视野，因此确定了代谢速率研究和生理状态表征的平台。最后，化学工程是应用工程方法来研究生物体系最合适的渠道。从一般意义来说，该方法中在生物系统研究中融合了集成、定量以及关联的概念。更特别的是，化学工程提供了系统分析的工具和经验。所涉及的系统中，速率过程是控制因素，化学工程在这些领域中非常擅长并做出了突出贡献。

代谢工程的多学科性质毫无疑问成为代谢工程实现其目标的一个有利条件。与此同时，这就使得必须将代谢工程与相关领域区分开来。在我们看来，代谢工程的独特点在于包含如下概念：代谢途径、代谢通量和在简单途径及更实际的代谢网络中控制代谢通量的因素。此外，代谢工程必须包括实验和理论两种方法用以胞内代谢通量的确定，具体方法包括用物质平衡、同位素标记、光谱学方法（如核磁共振）及衍生发展而来的方法（如气相色谱-质谱）来测定关键代谢物的同位素含量和（或）分子量分布等。由于这些测定结果与生成这些代谢物的途径通量的大小是相关的，因此可以利用这些信息来推测代谢通量。途径通量的概念、胞内通量的确定方法以及通过代谢通量的系统研究所得到的结论，被统称为代谢通量分析。这在整个通量控制研究中占据重要位置，本书对此将详尽介绍。

1.1 代谢工程的重要性

代谢工程是涉及宽阔的基础研究和重要实用价值的领域。代谢工程的基本贡献在于其对胞内通量控制的测定和理解。如前所述，一些代谢图谱尽管很详尽，但很少表达出通过不同途径的碳、氮及能量的实际通量的信息。结果是，尽管这些代谢图提供了营养物质转化为产品、能量以及还原力的可能路线，但并没有揭示出在特定条件下处于活性状态的实际代谢途径。代谢通量分析揭示途径参与一个总的代谢过程的程度。此外，通量控制的阐述为在关键代谢分支点合理处理所观察到的通量及通量分布提供了机理的基础。由于这些通量是在胞内条件下确定的，代谢通量分析允许对胞内和胞外酶催化特性进行正确的比较。最后，代谢通量提供了比较菌株变异体的总的基础。即使这些菌株的发酵特性有区别，但如果关键分支点处的代谢通量分布并没有改变，那么这些发酵特性的差异相对来说是不太重要的。

代谢工程给化学工程师提供了从事生物学研究的一个极好机会，因为它可以直接利用动力学、传递以及热力学的核心主题去分析代谢网络中的反应。在此意义上，代谢网络可以看成一个化工厂，其中的单元就是各个单个的酶，因此也有类似的设计、控制和优化问题。如果想通过对所选的酶的扩增来扩大微生物的碳通量，我们可以得益于化工厂的放大原理，即一些关键操作单元的协调放大。类似地，产率最优取决于通过最优通量分布所得到的副产物最小。当然，只有当控制通量的因素被首先识别并被充分理解之后，通量优化才有可能。

代谢工程的另一贡献源于其特别强调集成和量化的方法。代谢工程的一个重要目标是理解代谢途径的整体功能，最好是通过代谢途径结构单元（即组成的生化反应）的整合来进行。然而，系统的特性并不是其各组成单元的简单加和，因此，当利用一个个基因和反应根据遗传学和酶的信息来尝试重新构建细胞特性时，必须处理复杂性问题。为了提供综合性细胞功能的需要，对于还原论者多年研究成果的许多单独的信息进行整合，我们预期将会得到日益增多的关注。随着基因组学研究所预料的信息激增，这种需求将更加明显。在这种情况下，代谢工程为使生物信息得到升级，并综合运用这些信息达到开发有用产品和过程的目的，提供了有用的平台。同样，得益于代谢工程领域进一步研究的基础生物化学及代谢的重要性问题。包括总的生物控制结构、分层次调节结构及酶反应的通道效应(channeling effects)等。

为了研究细胞代谢，由代谢工程所提供的知识框架还需要补充适当的测量以取得最好结果。因此，为了解密代谢或其它反应网络，代谢工程在表征至关重要的测量结果方面，起着关键的作用。在代谢网络研究中，这使人们更加注意到与胞内通量测量有关的问题。对于信息网络研究，为了阐明和量化以蛋白质为中介的级联反应所处理的信息通量时，代谢工程同样可以确定分析方面的需要。在所提供的框架中，由于这些测量所带来的益处日益明显，这可推动着这些检测仪器的发展。

如上节所述，对代谢途径中通量控制结构的阐明，为一个细胞催化剂的最优酶分布的合理设计提供了巨大的机遇。这种活动应看做是对分子生物学工具箱的一种补充，这些工具用于完成基因转移和其它类似的修饰等工作。实际上，这些方法在近几年已发展得非常迅速，以至于为识别目标基因和酶而进行的代谢途径的合理分析已成为定向优化细胞功能的限制性因素。之所以这么说，是因为直至目前的观察，基因工程开拓性发展 20 年后的今天，现代生物技术在燃料、化学品或材料生产（工业酶除外）等领域几乎没有重大应用。尽管前四大生物技术公司中有两家最初将商业目标集中在这几个领域内，但由于后来又认识到医药保健行业在技术上更容易鉴别，且经济上更有吸引力的机会，所以这些公司又将发展方向转移到了医药领域。现在有理由认为，生物技术应用的前景正在迅速改变，而且未来的发展机会将包括制造领域的许多应用。有三种驱动力支持这种说法：两个是经济方面的，一个是技术方面的。

生物技术在制造领域应用的第一个驱动力是：世界范围内糖类原材料生产量的持续增加。这种资源的最天然的应用就是通过生物技术生产衍生物。这些产品中有些已开辟了市场，但是许多产品，尤其是在材料领域的许多产品将有全新的应用，存在着令人鼓舞的商业机遇。第二个驱动力就是生物技术产品生产成本的持续下降，而化学过程生产的产品成本的不断增加的趋势。形成这种趋势的原因虽不完全清楚，但是大规模发酵生产的规模效益的实现以及化学过程所造成的日益增加的环境负担都是形成这种趋势的因素。我们注意到，并非所有的生物技术过程都完全能与化学合成过程竞争，但是人们已普遍认识到两种过程的成本正以不同的斜率在改变着，而且交叉点将很快出现。根据工业界科学家的说法，加速这种趋势的极为重要的因素就是：在生物技术生物加工过程中由代谢工程所导致的产品选择性的改进。

最后一个驱动力是通过所发展的技术力量——现代分子生物学技术。这些技术虽然与用来定位需要操纵的关键酶的匹配能力还不一致，但近几年的进展有理由使我们对于方法学的发展感到乐观。这些进展将使我们能够识别代谢网络中的关键酶，识别为使目标产品的得率得到大幅度改变而需要进行修饰的类型。

在工业生产中代谢工程能做出重大贡献的一些特定领域包括：发酵法及在完整植物中表达（PHA 的生物合成）、生产热塑性塑料（其目前由石油路线生产）、新材料的生产以及诸如聚酮物等新的生物活性物质的生产。胶类、溶剂、多糖、蛋白质、各种抗生素、食品、沼气、寡肽、醇类、有机酸、维生素、氨基酸、细菌纤维素酶、谷胱甘肽衍生物、脂类、油类以及色素是目前通过生物法生产的一部分产品，或是目前主要在微生物中进行代谢操作的目标产品。代谢工程原理的突破将会对这些过程的效率和经济学产生直接的影响。

需要强调的是：在工业上，代谢工程的最终应用目标就是设计和创造出最优的生物催化剂，以达到目标产品的最大得率和生产能力。从这个意义上讲，代谢工程等同于化学加工工业中的催化作用，尽管很难准确预测代谢工程领域的近期方向，但是上述的类似使我们很容易展望其长期的影响。这种影响首先来自于以应用分子生物学为基本核心的全新工业的发展，以及由应用分子生物学而产生的可行技术。正如在世纪之交出现的化学工程是以化学为中心实现其工业应用的领域一样，我们可以展望为了发展分子生物学的工业应用，将会出现一个生物化学（或生物代谢）工程的新领域。代谢工程的主要范例效仿于化学工程范例。从这个方面讲，旨在为过程优化而开发生物催化剂的代谢工程，将在生物加工过程中起着与在化学过程中应用多年的催化作用相同的作用。正如许多化学过程仅仅是在开发出合适的催化剂后才成为现实一样，生物技术的巨大潜力只有在很大程度上通过代谢工程开发出有效的过程生物催化剂后才能变为现实。目前对许多不同微生物和其它种类生物基因组的测序工作使这些可能性更加接近现实。正是基于这一点，代谢工程在工业应用的长远潜力应当予以评估。

除了上述生产方面的应用之外，代谢工程在医学领域将产生重要影响，主要焦点是通过识别确切的靶标进行药物开发、疗法设计和致力于基因疗法的设计。目前，人们利用上述方法确定与特定疾病有关的一个单个酶反应步骤为靶标。然而，还不能保证一个单个反应的操作会转化成人体的系统的响应。从这个角度看，代谢工程在医学方面的应用与前面提到的在工业生产上的应用没有什么不同。因而可以得益于代谢工程的发展：即在医学处理中对实验结果进行更好的分析以及应用靶标合理选择方法。

最近，在化学式中包含有几个手性中心的一类新药正在不断生产。由于这种药物分子是很难用有机化学合成方法来合成的，因而，在总的化学合成过程中已经用酶来进行其中一个或多个困难的步骤。人们希望通过将表达产品合成过程中所需的所有酶的基因转入某个微生物，从而使所有反应步骤整合在一个单个微生物中。从不同生物体中识别并转移这些基因及其在宿主细胞中的表达，当今已成为制药行业越来越引人注目的主题。这种应用是代谢工程的原理为执行某种特定任务在反应途径合成中的又一例证，其不是使用相互独立的单个酶。通过代谢工程的引入而导致的技术发展将有助于需求量很大的药品生产。

最后，代谢工程的概念和方法在医学领域的应用即胞内组织、整合器官的功能和总体代谢的分析。也许通过肝脏功能的分析能充分体现出这些可能性。虽然肝脏的系统功能已被广泛研究而且总的来说已被充分理解，但是对于肝脏内部的各种代谢途径对肝脏器官功能的贡献还没阐明。例如，已知肝脏代谢在糖原异生过程中及通过脱氨基作用在尿素生产中起着重要作用；此外，在肝脏的正常活动过程中，氨基酸的吸收和生成有着复杂的分布。然而，这些功能会因烧伤而剧烈变化或对细胞因子和典型应激激素的药物作用而做出强烈的响应，这些激素包括：胰增血糖素、氢化可的松和肾上腺素等。肝脏在整个代谢过程中并不是一个被动的参与者，相反，肝脏在调节人体中氮的排除、葡萄糖生成以及维持生理的氧化还原作用

和能量状态等方面起着积极的作用。人们已充分了解了使这些功能起作用的整个生化反应网络，然而对于参与加工碳骨架和氮的特定反应途径还不了解，尤其是还不清楚控制通过主要代谢途径的碳、氮通量分布的各种因素。由于这些因素对于保持正常条件下或诸如损伤等干扰条件下的肝脏的功能起着重要的作用，因此很有必要识别出这些因素并对其充分表征。所以这个领域的研究应努力表征肝脏内正常条件下的糖原异生、尿素生成以及氨基酸加工的代谢过程中主要途径的通量分布。这可通过在可控的环境条件下，根据生理介质的进料对灌注的肝脏仿效连续的体系而进行。必须通过酶动力学和代谢物调节来解释这个网络的通量，尤其是由烧伤或通过引入细胞因子或激素等介体而引起的通量的变化。最后，正常条件下和由细胞因子及应激激素等物质刺激的条件下，肝脏细胞的细胞培养物系内的关键代谢途径都需要被识别。这两种条件下的关键代谢途径不同，会给我们提供有关整个器官功能的胞内酶动力学和代谢物调节是具有重要价值的信息。正是通过这种类型的研究可以使我们对像肝脏一样的整个器官的实际功能进行更好地理解，这既可以在一个范围广泛的系统构架内进行，也可进行一个个生化反应的总体重建。

1.2 本书的概要

本书用于阐明代谢和代谢工程的方法具有普遍的适用性。然而，有些体系根据其本身的特性，更加符合这里所说的分析类型。同时，我们也注意到对于相似的目标，例如代谢通量和通量控制系数的测定，本书所建议的方法与其它学科所用的方法不同。在其它领域，使用遗传上简化了的生物系统来努力获得代谢通量、控制系数、弹性系数以及其它参数。这些突变株在竞争性的途径上带有缺陷，能通过一些胞外代谢物浓度变化速率的改变来直接测量通量。尽管这种方法已取得一些令人关注的结果，但总的来说，由于一些原因使得这种方法具有局限性。这种简化的突变株并不总是很容易构建出来的，它们通常表现出不同的特性。最后的但并非最不重要，人们还不清楚，在这些改变了的体系中，观察到的途径是如何与原来体系中的途径相联系的。本书中的方法是用来研究未经改变的生物系统，但补充了现代仪器所允许的尽可能多的测量。利用这种方法，从重建的代谢网络中得到了代谢通量及其衍生量，以更好地描述速率和标记代谢物的测量。通过在通量确定过程中引入高冗余度，使得实际上代表胞内实际通量值的置信水平得到了很大提高。

以某种方式，我们可以在通量测定和材料结构表征之间寻求某些类比。在材料科学中，没有单一的方法能够提供所研究材料的全部结构。然而通过使用若干不同的技术，就可以测定出这种材料的结构，其与根据假定的材料结构而进行重建的材料结果极为一致。类似地，我们可以首先假定一个生化网络，并确定其通量，以致大量不同的、相互独立的、多维的测量与所假定的生化结构得出的通量预测值非常一致。

在开始就描述这个实验体系是很重要的，因为上述方法是最适用的。这种体系包括一个连续的生物反应器，微生物或其它细胞在其中生长并达到一个稳态。对反应器入口处和出口处的代谢物进行测量，可以得到主要代谢物生成或消耗代谢速率的精确估计值。另外，还可以直接向生物反应器引入精确设计的标记的底物脉冲，这种标记性底物被细胞吸收，并以各种形式重新出现在所分泌的产物中。最终产物中标记性元素的丰余度分析，还有核磁共振（NMR）波谱中代谢物峰值的精细结构分析，则为代谢通量的进一步解释提供了有力的结合。这种实验体系的一个非常重要的方面就是稳态概念，这种稳态是经过几倍于流动反应器的停留时间之后最终才达到的。在这种条件之下，代谢通量达到稳态，这时由代谢控制分析

所指定的所有重要响应量可以被确定。为了缩短这些实验的周期，分批或流加培养有时可以代替连续培养体系。然而，我们应记住的是，在这种条件下，所有的数据点中只有一部分对代谢通量分析是有用的，这就是那些当环境条件保持相对不变的情况下所采集的数据。然而，在系统地改变实验条件方面，其适应性是有限的。很明显，从根本上来说，流动反应器系统才适用于微生物和细胞培养的研究。应当寻求创造性的替代实验系统，以利于其它物系（如植物和器官）的研究。在前述肝脏功能分析中所建议的整个器官的灌流培养就有可能作为一个稳态恒化器的框架，从而得到关于肝脏完整功能的宝贵信息。

这本书包括两部分，由于读者的背景各不相同，第Ⅰ部分介绍了代谢概论及对代谢进行综合性定量描述的框架。在这里我们并不打算取代能在其它优秀教科书中找到的生物化学基本原理。我们的目的是将这些知识与总体代谢的内容整合在一起，并利用化学反应工程的概念对其进行系统定量的描述。在第 2 章，回顾了细胞反应：从物质运输过程开始，接下去是包括在分解代谢和合成代谢中基本的生化途径。其中一个重要组成部分就是从分解反应中获得能量和在合成代谢中能量消耗的问题，因为，从中我们可得到在菌体生长和产物形成过程中真正能量得率的宝贵信息。进而，利用这些平衡，可将整个代谢中的许多不同的组成部分通过其对流通代谢物生成和消耗所做的贡献整合起来。

第 3 章介绍细胞反应模型化的综合框架，包括化学计量学考虑以及在确定反应速率时使用的动态物料平衡。额外引入关于能量对细胞功能的一些附加的假设，可以导出一些有用的系数和速率方程，这些已从经验观察到了。从基本原理和合理的假设衍生而来的系数的速率方程为解释实验数据提供了一个合理的基础。一般来讲，速率方程在细胞模型分析中是最大的不确定性的来源。因此，不使用关于生化反应动力学的任何假设，而仅仅根据元素平衡和能量平衡来研究大量信息是很有用的。这就是第 4 章的主题，其导致衍生出速率测量必须满足的一些约束条件。这些约束条件来自基本的元素平衡，并可用做检验测量与假设的生物化学之间的一致性。当这些平衡不满足时，也可用其判别测量误差或假设的生物化学误差的可能来源。第Ⅰ部分的结尾对代谢途径的调控进行了评述。从单个酶或基因水平到操纵子及整个细胞水平，对转录调控和酶调控进行了多层次的代谢控制方面的讨论。还引入了模型来定量描述效应物和抑制物在酶水平上对调控的影响。

第Ⅱ部分首先对途径操作的应用进行了广泛的述评。这是第 6 章的主题，其提供了一些代谢工程有益的应用实例。在介绍这些实例时，我们部分遵从了在 Cameron 和 Tong (1993) 的工作中建议的代谢工程应用的分类。以功能作为主要分类标准，这些例子被分类为：宿主微生物已能生产的化学品的生产改进，扩大菌体生长和产物合成所需底物的范围，增加了能降解有毒化合物的新的代谢活性，生产出原宿主不能生产的新化合物，使整体的细胞性质发生极大的改变等。在大多数情况下，举例中提供了详细的途径、主要问题摘要以及代谢工程为解决这些问题所采用的方法。书中举的例子很多，旨在提供一个广泛的应用范围以便能为将来在其它类似的体系中应用时提供指导。

代谢工程的一个重要目标就是为特定产物的生物合成提出可选择的途径。这可通过在某一特定的酶数据库内，完全列出连接一组特定产物和一组反应物的所有可能的途径来完成该任务。该过程可能很复杂，会导致大量途径产生。有一种算法，能够生成所有这些途径，其很完整而且适宜于在合理的机时内完成，这部分内容在第 7 章加以介绍。

第 8 章详细介绍了代谢通量分析。首先介绍了理论背景，接下来讨论了为解决很复杂的体系所需信息的数量和类型。取决于体系中所含的途径个数和所做的测量个数，可将所研究

的系统分为正定、超定和未定系统，每种情况具有不同的分析类型。在确定胞内通量的方法中，胞外的测量值是主要的输入量，见第 8 章。很明显，仅仅通过胞外的方法确定通量的解析是很有限的，附加通量和（或）通量分配比可通过引入更多的测量而得到，尤其是通过使用同位素标记来获得。在第 9 章中列举了一些实例，用以说明在测定通量过程中如何使用物质平衡、放射性标记、光谱学方法以及气相色谱-质谱（GC-MS）等测量方法。在第 10 章中通过对两个具体实例的详细研究，完成了代谢通量分析的主题。这些实例研究来自于作者以谷氨酸产生菌生产氨基酸和哺乳动物细胞培养的一些经验。

在敏感性分析的框架中，可以很好地进行通量控制分析，这种敏感性分析用来定量描述在每一个途径上通量控制的程度。代谢控制分析（MCA）提供了一些方法，用于描述由单个酶或影响酶活性的因素所施加的（酶）局部控制和（系统）全局控制的程度。在 MCA 的框架中，有可能将局部的酶反应动力学和整个途径的通量控制联系起来，这样，就可以根据组成的各个单个反应的动力学和调节特性，重新构建起代谢网络的系统功能。第 11 章叙述了 MCA 的基本概念以及线性途径和分支途径中 MCA 的全面描述，其中，许多讨论是围绕着运用通量控制系数作为通量或代谢物控制的度量标准。取决于可利用的信息量，可以选择严格的定量的 MCA 方法，或第 5 章中更加定性地估计代谢物或节点的刚性。第 11 章以介绍大扰动的理论作为结束，这是 MCA 的重要扩展，它有助于从实际的大扰动实验中测定通量控制系数，而不是像其数学定义所表达的那样，根据无限小的扰动实验来计算这些系数。

在复杂的代谢网络中，应用 MCA 的一个重要的限制就是这样的系统中含有大量的反应。作为从上至下方法的一部分，第 12 章介绍了反应分组法及其分组规则，以便得到可靠的组控制系数的估计。在这一章中定义了组控制系数和组弹性系数，为复杂反应网络的系统解剖和分析提供了标准。通过使用一个代谢网络的替代模型来模拟实验，使这些思想得到进一步发展并作举例说明。使用替代细胞模型是一种很有用的方法，因为它允许我们绕开在通量优化策略导出中所需的耗时且昂贵的实验。这一章介绍了系统地使用反应分组规则来识别代谢网络中的关键分支点。对分支点处的反应进行分组，以及相应组控制系数的确定，为每个反应组对所关心的通量或代谢物的控制程度提供了度量标准。这种方法可以在复杂网络中将通量控制进行定位。第 13 章介绍了利用这些结果进行定向通量扩增的策略。其目标是通过所选反应的协同放大而使网络的通量增加，而不是常用的单个反应策略。需要指出，第 12 章和第 13 章介绍的方法完全是以组通量测量和大扰动理论为基础的，其中包括一些假定。因此确保满足这些假设是很重要的，为此目的第 13 章发展并介绍了一些内部的检测方法。

这本书以第 14 章作为结尾，其中讨论了几个关于细胞途径热力学的重要概念。首先叙述了与生化反应相关的一些热力学原理，然后将基于单个反应的标准吉布斯（Gibbs）自由能变化（包括数值及正负号）的热力学可行性概念扩展到反应途径。结果表明，标准吉布斯自由能变化的正值程度通过代谢物浓度的差异来克服的方法有局限性。当具有正 ΔG^0 的反应数量增加时，需要抵消这些大的正值 ΔG^0 所需的所有代谢物浓度的差也要增加。在一个代谢途径中，如果限制其所允许的最小浓度，那么反应步骤或一系列反应步骤可以看做在热力学上是不可行的，这样就在代谢途径中建立了局部的或更加分散的热力学瓶颈。尽管热力学瓶颈不一定要与动力学限制条件相关，但是有可能从热力学分析中获得一些关于动力学瓶颈的信息。通过使用这一章所述的热力学和不可逆热力学概念，可以达到上述目的。

参 考 文 献

Bailey, J. E. (1991). Towards a science of metabolic engineering. *Science* **252**, 1668-1674.

Cameron, D. C. & Tong, I. -T. (1993). Cellular and metabolic engineering. *Applied Biochemistry Biotechnology* **38**, 105-140.

Heinrich, R. & Rapoport, T. A. (1974). A linear steady-state treatment of enzymatic chains. *European Journal Biochemistry*. **42**, 89-95.

Kacser, H. & Burns, J. A. (1973). The control of flux. *Symposium Society of Experimental Biology* **27**, 65-104.

Kellogg, S. T., Chatterjee, D. K. & Charkrabarty, A. M. (1981). Plasmid-assisted molecular breeding: new technique for enhanced biodegradation of persistent toxic chemicals. *Science* **214**, 1133-1135.

MacQuitty, J. J. (1988). Impact of biotechnology on the chemical industry. *ACS Symposium Series* **362**, 11-29.

Nerem, R. M. (1991). Cellular engineering. *Annals of Biomedical Engineering* **19**, 529-545.

Stephanopoulos, G. & Vallino, J. J. (1991). Network rigidity and metabolic engineering in metabolite overproduction. *Science* **252**, 1675-1681.

Timmis, K. N., Rojo, F. & Ramos, J. L. (1988). In Environmental Biotechnology, pp. 61-79. Edited by G. S. Omenn. New York, NY: Plenum Press.

Tong, I. -T., Liao, H. H. & Cameron, D. C. (1991). 1,3-Propanediol production by *Escherichia coli* expression genes from the *Klebsiella pneumoniae dha* regulon. *Applied and Environmental Microbiology*. **57**, 3541-3546.

第 2 章　细胞代谢综述

代谢途径化学计量学的确立是细胞代谢定量处理的基础，这需要懂得一些基本的生物化学过程以及活细胞体内通常存在的不同代谢途径方面的知识。这一章我们将回顾活细胞的基本代谢功能。主要集中于细菌和真菌的代谢，也包括高等真核生物生物化学的一些方面。为了更全面地讨论一般的生化概念和代谢过程，读者可参考一些优秀的生物化学书籍［如 Zubay（1988），Stryer（1995），或 Voet and Voet（1995）］。本章的目的不是取代生物化学，而是通过将生物化学概念与细胞代谢的总体框架进行综合处理，对通常的生物化学课程进行补充。从这一方面来讲，这一章尽管自成一体，但其内容紧凑，对即使具有较少生化背景（例如只有大学初级生物化学课水平）的读者也能很好地读懂它。

2.1　细胞代谢概述

活细胞体内含有大量不同的化合物和代谢物，其中水是含量最多的组分，约占细胞物质总量的 70%。细胞质量的其余部分，通常指干细胞重生物质，主要包括大分子 DNA，核糖核酸（RNA），蛋白质，脂类以及碳水化合物（见表 2.1）。这些大分子合成和组织成一个功能细胞是通过几个独立反应步骤而进行的。合成这些大分子物质的前体物来自一个数量不多但被快速利用的低分子量前体库，这些低分子量化合物是由葡萄糖或其它碳源最终生成的代谢物通过生化合成而不断补充的（见图 2.1）。根据其在整个细胞合成过程中的主要功能，这些不同的反应可以分为如下几类（Neidhardt et al，1990）。

● 组装反应　包括如下过程：大分子物质的化学修饰，进而运输到细胞中预先指定的位置，最后缔合形成细胞组织，如细胞壁、细胞膜和细胞核等。这些反应在本书中将不再进一步介绍。

● 聚合反应　活化的分子定向有序地键合成长的（分支或不分支）聚合链。相当数量的结构单元通过这些反应形成大分子物质。

● 生物合成反应　通过这类反应生成聚合反应中所需的结构单元，同时也生成辅酶和相关的代谢因子，包括信号分子。有一些生物合成反应，发生在称为生物合成途径的功能单元中，每一个反应包括一个或一系列顺序的反应，最终生成一个或多个结构单元。这些途径容易识别，并被整体控制。在一些情况下，这些反应由酶来催化，这些酶是由形成一个操纵子的一组相邻基因转录来的 mRNA 制得的（见第 5 章）。所有的生物合成途径都起始于 12 种前体代谢物之一。一些途径直接从这种前体代谢物开始，另一些途径间接地从一个中间物的分支或一个相关途径的末端产物开始。

● 供能反应　用以生成生物合成所需的 12 种前体代谢物。同时，还以 ATP 的形式产生吉布斯自由能用于生物合成反应、聚合反应和装配反应中。最后，供能反应还生成生物合成反应所需的还原力。供能反应包括称作分解代谢途径（降解底物及氧化底物）的所有生化途径。

不同的生化途径借助于参与多个途径的代谢物而联系起来，这些途径通过不同分支将一个又一个反应顺序连接了起来。途径之间另一种层次的整合是通过辅助因子分子来协调的。

表 2.1　大肠杆菌细胞的一般大分子平均组成

大分子	占总细胞干重的百分率	分子的不同种类	大分子	占总细胞干重的百分率	分子的不同种类
蛋白质	55.0	1050	脂类	9.1	4
RNA	20.5		脂多糖	3.4	1
rRNA	16.7	3	肽聚糖	2.5	1
tRNA	3.0	60	糖原	2.5	1
mRNA	0.8	400	可溶库	3.9	
DNA	3.1	1			

注：此表数据来自于 Ingraham et al（1983）。

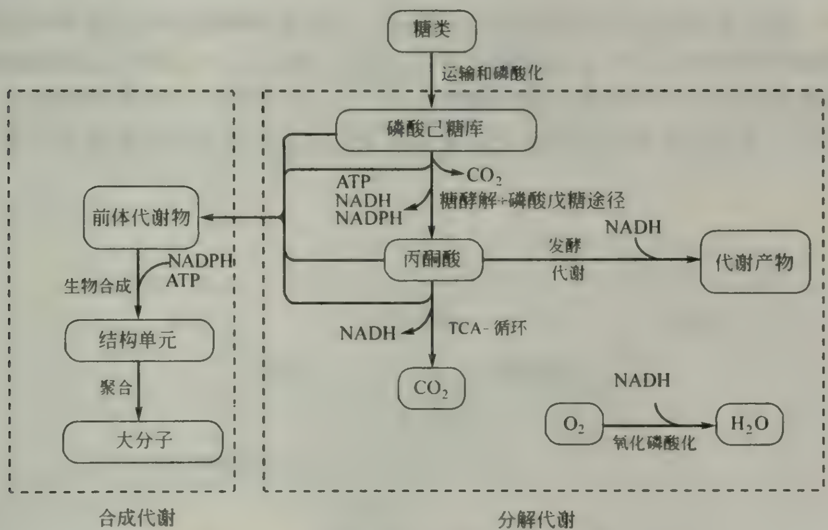


图 2.1　利用糖类进行细胞合成的总框架

糖类被运输进入细胞，首先被磷酸化然后进入磷酸己糖库。磷酸化可独立于运输过程或与之相耦合。磷酸己糖进入糖酵解反应并生成丙酮酸，或被用于合成一些碳水化合物。丙酮酸可通过呼吸循环氧化成二氧化碳，还可以通过发酵途径转化成代谢产物。对于好氧微生物，在糖酵解和 TCA 循环中生成的 NADH 形式的还原力可通过氧化磷酸化被氧化成 NAD^+，而对于厌氧微生物，NAD^+ 是通过发酵途径生成的。糖酵解途径和 TCA 循环中的一些中间代谢物可作为前体代谢物用于生物合成结构单元。这些结构单元被聚合成大分子物质，并最终被组装成不同的细胞结构

这些辅助因子包括总的流通代谢物 ATP，NADH 和 NADPH 等，其对许多反应是必不可少的。由于这些辅助因子在供能生物合成反应中的中心作用，通过它们连续地生成，并且利用这些辅助因子把同一途径中和不同途径中的各个反应连接起来，如图 2.1 所示。

生化途径可以用化学方法通过在一长串反应中进行的代谢物的连续转化来组织，也可用物理方法通过在细胞的不同部位和不同结构中起作用来组织。这种物理上的组织结构在真核生物中最明显，其中膜结合的结构为系列或单个生物化学反应的定位提供了明显的证据。因此，DNA 和 RNA 的合成在细胞核中进行，许多供能反应和生物合成反应在线粒体中进行。这种组织结构也许对细胞的整体代谢具有重要的影响，但由于其复杂性，而且缺乏有关局部浓度变化的详细信息，我们将不再进一步讨论代谢途径组织结构方面的内容。

除了代谢反应和途径的化学和物理（结构）的组织外，另一个非常有用的分类依据是以特征时间来表示其动力学。细胞代谢中许多不同的反应都影响着各种途径和整个生长过程的动力学。由于不同反应在不同的时间尺度上进行，因此，当考虑一个反应途径时，只需包含那些在时间尺度上有可比性的反应。可以假设较快反应在慢速反应的上游处于平衡，或在一

个慢速反应的下游使代谢物处于稳态。同时，更慢的反应可被忽略，因为这些反应在完全不同的时间尺度内进行，同时在感兴趣的时间框架内其影响极小。在一个给定时间框架内的反应的相关性通常通过比较各个反应的松弛时间来评价，松弛时间被定义为近似一级反应过程的特征时间（见方框 2.1）。图 2.2 对活细胞内进行的不同过程的松弛时间进行了比较。当某过程的松弛时间比目的系统的松弛时间长很多时，那么通常认为这个过程是冻结的。例如，突变过程一般慢于细胞生长，因此在研究细胞生长时，可以忽略突变过程。相反，当某一过程的松弛时间远小于系统的松弛时间时，通常认为这个系统正处于拟平衡。因此，酶催化反应只有毫秒级的松弛时间，与细胞生长的松弛时间（通常为小时级）相比酶反应速率非常快。因此，酶反应能对新的环境条件迅速响应，反应速率和相关的代谢物可达拟稳态。如果一个过程的松弛时间是目的系统松弛时间的 10 倍，那么这个过程可认为是冻结的，如果一个过程的松弛时间是目的系统松弛时间的 1/3，那么该过程可认为处于拟稳态。这就导出如下重要结论：通过忽略在目的系统时间尺度范围之外进行着的反应和途径可显著简化代谢过程。

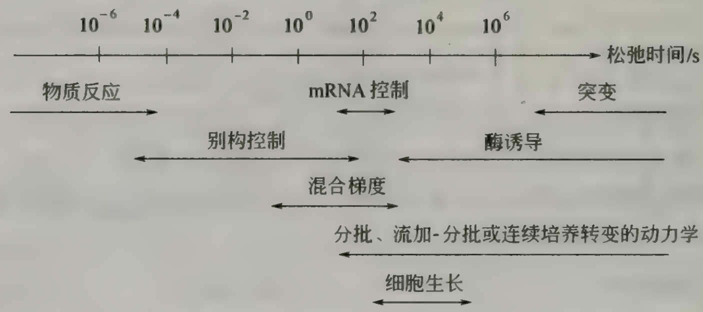


图 2.2　不同细胞过程的松弛时间与生物反应器操作松弛时间的比较

方框 2.1　松弛时间

对于反应物为一级反应速率的化学反应

$$r = kc \tag{1}$$

松弛时间定义为反应速率常数的倒数

$$\tau = 1/k \tag{2}$$

松弛时间等于过程的特征时间。如果对一个处于稳态的体系进行扰动，那么松弛时间就是体系从原来的稳态达到新的稳态所需时间的 0.63 倍[(1－1/e)＝0.63]。如果过程不是一级的，那么松弛时间的定义被扩展为

$$\tau = c/r(c) \tag{3}$$

表示如果该过程是一级过程时应有的特征时间。

对于非一级过程，很明显松弛时间是反应物浓度的函数（更一般地说，是所有状态变量的函数）。因此，松弛时间不是常数。但实际上代谢物浓度的变化一般都限制在一定范围内，这也就将实际的松弛时间限定在一个合理的时间范围内。

对于一个单分子反应

$$A \underset{k_{-1}}{\overset{k_1}{\rightleftarrows}} B \tag{4}$$

通过物料平衡，其动力学可描述为

$$\frac{\mathrm{d}c_A}{\mathrm{d}t}=-v_1(c_A)+v_{-1}(c_B);\quad c_A+c_B=\text{定值} \tag{5}$$

通过围绕体系平衡进行线性化处理，我们可以写出 A 物质浓度与其平衡浓度 $c_{A,0}$的偏差，即 $\sigma_A=c_A-c_{A,0}$。

$$\frac{\mathrm{d}\sigma_A}{\mathrm{d}t}=-\left(\frac{\mathrm{d}v_1}{\mathrm{d}c_A}+\frac{\mathrm{d}v_{-1}}{\mathrm{d}c_B}\right)\sigma_A\Rightarrow\sigma_A(t)=\sigma_A(t_0)\exp\left(-\frac{t-t_0}{\tau}\right) \tag{6}$$

式中特征时间 τ 由下式表示

$$\tau=\left(\frac{\mathrm{d}v_1}{\mathrm{d}c_A}+\frac{\mathrm{d}v_{-1}}{\mathrm{d}c_B}\right)^{-1} \tag{7}$$

或对一级动力学($v_1=k_1c_A$ 和 $v_2=k_{-1}c_B$)

$$\tau=(k_1+k_{-1})^{-1} \tag{8}$$

类似地，对于双分子反应有

$$A+B\underset{k_{-1}}{\overset{k_1}{\longleftrightarrow}}C+D \tag{9}$$

其特征时间为

$$\tau=[k_1(c_{A,0}+c_{B,0})+k_{-1}(c_{C,0}+c_{D,0})]^{-1} \tag{10}$$

这里，下标中的 0 指平衡浓度。

2.2 运输过程

不同种类的物质穿越原生质膜运输有三种不同的机制：(1) 自由扩散；(2) 促进扩散；(3) 主动运输。前两种机制是被动的过程，原则上不需要吉布斯自由能的供应。在自由扩散和促进扩散中，物质沿着浓度梯度被运输。这两种运输机制的不同之处在于促进扩散是需要以载体为中介的，也就是说，在物质运输过程中需要特定的载体或跨膜蛋白，而自由扩散是分子运输，在化学势能差的驱动下进行。第三种运输机制即主动运输，它允许物质逆着浓度梯度进行运输，但需要吉布斯自由能的参与。主动运输在需要特定的膜定位蛋白或渗透酶调节方面与促进扩散相似。

2.2.1 被动运输

一个化合物以自由扩散的方式通过脂膜包括三个步骤：(1) 化合物从胞外培养基到膜相的传递；(2) 化合物在脂双层中扩散；(3) 化合物从膜相到细胞质的传递。通常细胞质和胞外培养基具有相似的物理化学特性，因此第 (1) 步和 第 (3) 步十分类似。一个化合物在两相之间的传递（即从胞外培养基到膜或从膜到细胞质)，与扩散过程相比一般是很快的，因此可假定处于平衡状态。因此，所运输的化合物在脂层相际间的浓度应等于其在水相中的浓度与分配系数 K_{par}的乘积（分配系数被定义为化合物在脂双层中的溶解度与在水中的溶解度之比)。分子扩散的质量通量遵从 Fick 第一定律，所产生的扩散通量 ($mol\cdot m^{-2}$) 可用下式表示

$$r_{tran}=\frac{D_{mem}K_{par}}{d_{mem}}(c_a-c_c)=P(c_a-c_c) \tag{2.1}$$

式中，D_{mem}表示化合物在脂双层中的扩散系数 ($m^2\cdot s^{-1}$)；d_{mem}为膜的厚度(m)；c_a 和

c_c 分别表示该化合物在非生物相中和细胞质中的浓度。方程式（2.1）中的三个参数 D_{mem}，d_{mem}和 K_{par}通常可合并为一个参数$[(D_{mem}K_{par})/d_{mem}]$，称为渗透系数 P（Stein，1990）。在式（2.1）中，质量通量的定义基于细胞表面积，但通过乘以细胞的比表面积 $a_{cell}[m^2\cdot g^{-1}$(干重)]就可以将其转化成每克干重的质量通量。

通过被动扩散所运输的化合物有：二氧化碳、氧、氨、脂肪酸和一些醇类。在解离状态时，有机酸在脂膜中实际上是不溶的，但许多未解离的有机酸却是非常可溶解的。未解离的乳酸和乙酸的渗透系数分别为 $5.0\times10^{-7}m\cdot s^{-1}$和 $6.9\times10^{-5}m\cdot s^{-1}$，这就意味着这些化合物穿越原生质膜时扩散得很迅速。由于主要是未解离形式可以自由扩散，因此像乳酸和乙酸这样的化合物，总的运输情况对其解离程度进而对细胞质和胞外培养基两者的 pH 都很敏感。对于许多生物体，穿越细胞质膜有一个 pH 梯度(细胞内的 pH 高)，这就会形成质子进入细胞的净流入。为了保持胞内低的质子浓度，必须在消耗 ATP(腺苷三磷酸)的条件下，由质膜 ATP 酯酶将这些质子泵出细胞外。因此，有机酸的存在会导致 ATP 的净消耗(见例2.1)。

【例 2.1】 有机酸引起的能量产生与消耗的解耦

Verduynet 等（1992）的一个研究中列举了活细胞内有机酸对 ATP 消耗的影响。通过分析苯甲酸对酿酒酵母呼吸作用的影响，他们发现菌体量对葡萄糖的得率随酸浓度的增加而下降，同时葡萄糖和氧气的比吸收速率增加。因此，对菌体合成来说，葡萄糖并没有被有效利用，这种结果可解释为：由于苯甲酸的质子解耦作用导致了 ATP 的消耗。在另一个研究中，Schulze（1995）分析了酿酒酵母厌氧培养中苯甲酸对菌体合成时 ATP 消耗的影响，发现菌体合成时消耗的 ATP 随着苯甲酸浓度的增加而呈线性增加，这是苯甲酸质子解耦作用的又一结果。Henriksen 等（1998）推导出一系列方程，以定量表示由于有机酸质子梯度的解耦作用所引起的 ATP 消耗情况。其研究的目的是定量表示苯氧基乙酸（青霉素 V 生产的前体物）对产黄青霉菌中质子梯度的影响。苯氧基乙酸的解离和未解离形式均可以以被动扩散的方式通过细胞膜，但未解离的酸有更大的溶解度，也就是说具有较大的分配系数，因此运输得更快。为了描述以这两种形式通过细胞膜的质量通量，Henriksen 等（1998）应用式(2.1) 得出下式

$$r_{tran,i} = P_i a_{cell}(c_{a,i} - c_{c,i}) \tag{1}$$

式中，下标 i 表示酸的解离形式或未解离形式。产黄青霉细胞的比表面积为 $2.5m^2\cdot g^{-1}$(干重)，苯氧基乙酸的未解离形式和解离形式的渗透系数被求出，分别为 $3.2\times10^{-6}m\cdot s^{-1}$和$2.6\times10^{-10}m\cdot s^{-1}$（Nielsen，1997）。

由于酸的未解离形式和解离形式在细胞质膜两边处于平衡状态（$HA \rightleftharpoons H^+ + A^-$）且平衡常数为 K_a，所以两种形式的酸浓度和总酸浓度的关系可用下式表示

$$c_{undiss} = c_{diss}10^{pK_a - pH} = \frac{c_{total}}{1 + 10^{pH - pK_a}} \tag{2}$$

式中，苯氧基乙酸的 pK_a 值为 3.1。在拟稳态条件下，未解离酸的净输入通量（$r_{undiss,in}$）等于解离酸的净输出通量（$r_{diss,out}$）

$$r_{undiss,in} = r_{diss,out}$$

或

$$P_{undiss}a_{cell}(c_{undiss,a} - c_{undiss,c}) = P_{diss}a_{cell}(c_{diss,c} - c_{diss,a}) \tag{3}$$

式中，下标 a 和 c 分别表示细胞膜非生物相一边和细胞质一边。将式（2）中膜两侧的总酸浓度用膜两侧的未解离形式和解离形式的酸浓度代替并重新排列，我们得到膜两侧酸的总浓度之比，如下式所示

$$\frac{c_{c,tot}}{c_{a,tot}}=\frac{P_{undiss}\frac{1+10^{pH_c-pK_a}}{1+10^{pH_a-pK_a}}+P_{diss}\frac{1+10^{pH_c-pK_a}}{1+10^{pK_a-pH_a}}}{P_{diss}10^{pH_c-pK_a}+P_{undiss}} \tag{4}$$

由于未解离形式酸的渗透系数的数量级远远大于解离形式，因此，式（4）可简化为

$$\frac{c_{c,tot}}{c_{a,tot}}=\frac{1+10^{pH_c-pK_a}}{1+10^{pH_a-pK_a}} \tag{5}$$

因为，在青霉素生产中胞内的 pH 通常高于培养基中代表性的 pH，所以式（5）表明细胞内的总酸浓度比细胞外的高。利用这个方程，Henriksen 等（1998）计算了当胞内 pH 值为 7.2 时，不同胞外 pH 条件下的酸的浓度之比。当胞外 pH 值为 6.5 时，酸的积累量低（约 2.3 倍），而当胞外 pH 值为 5.0 时，酸的积累量高（达 100 倍）。

在给定胞外总酸浓度的条件下，可利用式（2）计算出膜两侧两种形式酸的浓度，进而可利用式（1）计算出通过细胞膜的质量通量。由于解离形式酸的净输出通量等于未解离形式酸的净输入通量，因此酸运输的结果是质子的净输入，而为了保持恒定的胞内 pH，这些质子必须由细胞膜 ATP 酯酶重新输出。如果假定每向胞外运输一个质子需要通过 ATP 酯酶的反应而消耗一个 ATP，那么当胞外 pH 值为 6.5，胞内 pH 值为 7.2 时，Henriksen 等（1997）计算出这种无效循环所消耗的 ATP 达到了 $0.15mmol\cdot g^{-1}$(干重)$\cdot h^{-1}$。与其它非生长相关联但也消耗 ATP 的过程相比，这个值是较低的（见 2.6 节）。然而，当胞外 pH 值为 5.0（胞内 pH 值仍为 7.2）时，这个值变为约 $7mmol\cdot g^{-1}$(干重)，这是一种值得注意的 ATP 消耗（见 2.6）。从中可以看出为了生物合成的需要，维持穿越细胞质膜的酸浓度梯度是如何有助于 ATP 生成与消耗精确的解耦。

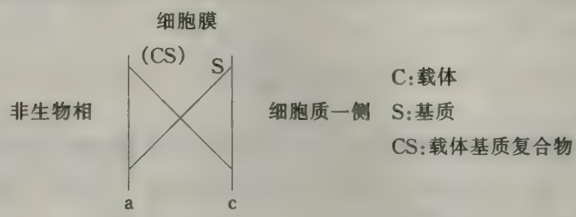
2.2.2 促进扩散

许多化合物以极低的速率通过自由扩散方式运输，因为它们在质膜中的溶解度很低。这类物质的运输可由于镶嵌在细胞质膜中的载体中介物分子而显著增强。这种运输是被动发生的，不需要能量消耗，称为促进扩散。在真核生物中许多物质的运输采用这种方式，原核生物中促进扩散仅有的几例是甘油在大肠杆菌中的运输以及葡萄糖在 *Zymomonas mobilis* 和 *Streptococcus bovis* 中的运输（Moat 和 Foster，1995）。与自由扩散一样，促进扩散只能顺着浓度梯度方向进行。然而，只有存在着游离载体分子时，这个化合物才能进入膜相，其运输的速率遵从饱和型动力学（如同酶催化反应的米氏动力学）（见例 2.2）。因此，在低底物浓度时，扩散速率为一级；在高底物浓度时，为零级。

在真菌中，许多糖类物质通过促进扩散进行运输。据报道（Bisson 和 Fraenkel，1983；Bisson 等，1993），在酿酒酵母中，葡萄糖通过促进扩散进行运输，而且存在着一个葡萄糖阻遏型的高亲和性体系（K_m 为 $1mmol\cdot L^{-1}$）和一个组成型的低亲和性体系（K_m 为 $20mmol\cdot L^{-1}$）。最近，通过克隆编码己糖转运蛋白的全部基因，进一步证明了酿酒酵母中葡萄糖运输的复杂性 [见 Kruckeberg 的综述（1996）]。对于丝状真菌，已经报道了不同的促进糖运输的转运蛋白，其 K_m 范围为 $8\sim20mmol\cdot L^{-1}$（Neilsen，1997）。

【例 2.2】 促进运输的饱和动力学

在许多生物体系中，已经发现化合物的促进扩散速率遵从米氏饱和型动力学，这样的速率表达式可由如下机理推出。首先，一个底物分子 S 与一个载体分子 C 结合形成复合物 (CS)，并自由扩散通过细胞膜。稳态条件需要那些反复将底物分子运进细胞的载体分子，从膜的胞内一侧重新扩散至胞外非生物相。该机理涉及的底物载体复合物浓度分布、游离载体以及所假定的平衡和运输过程如下。



$$C_a + S_a \underset{K_1}{\rightleftharpoons} (CS)_a \longrightarrow (CS)_c \underset{K_2}{\rightleftharpoons} C_c + S_c$$

总的运输速率可以以底物载体复合物或自由载体膜浓度表示如下

$$r_{transport} = \frac{D_{complex}}{d_{mem}}(c_{cs,a} - c_{cs,c}) = \frac{D_{carrier}}{d_{mem}}(c_{c,c} - c_{c,a}) \tag{1}$$

式中，带有下标的参数 $D_{complex}$和 $D_{carrier}$分别为底物载体复合物和游离载体在膜中的扩散系数；d_{mem}为膜的厚度；c_c 和 c_{cs}分别为载体和复合物的膜浓度。如上述所示，假定复合物的形成与解离反应处于平衡，则消去复合物的浓度可得

$$D_{complex}(K_1 c_{c,a} c_{s,a} - K_2^{-1} c_{c,c} c_{s,a}) = D_{carrier}(c_{c,c} - c_{c,a}) \tag{2}$$

总的载体守恒方程是

$$c_{c,a} + c_{c,c} + K_1 c_{c,a} c_{s,a} + K_2^{-1} c_{c,c} c_{s,c} = c_{total} \tag{3}$$

结合式 (2) 和式 (3)，可以解出游离载体的浓度 $c_{c,a}$和 $c_{c,c}$，再代入式 (1) 中，就可以得到运输速率。会出现一个有趣的限制性情况：如果胞内底物浓度为 0，即 $c_{s,c} = 0$，即一旦底物被运输进入细胞，就被迅速代谢转化掉。在这些条件下，膜的非生物相一边的载体浓度如下：

$$c_{c,a} = c_{total}\left[2 + \left(\frac{D_{complex}}{D_{carrier}} + 1\right) K_1 c_{s,a}\right]^{-1} \tag{4}$$

如果我们进一步假定载体和载体底物复合物的扩散系数近似相等，那么将式 (4) 代入式 (1)，就得出运输速率

$$r_{transport} = \frac{D_{complex}}{d_{mem}} \times \frac{c_{total}}{2} \times \frac{K_1 S_a}{1 + K_1 S_a} \tag{5}$$

前面的方程展示了相应于非生物相中底物浓度的饱和特性，需指出的是：前述的运输机制与通常的 Michaelis-Menten (M-M) 酶催化反应机制相同，运输步骤作为整个过程中的慢速步骤代替了酶反应过程中产物的形成步骤。其结果是 M-M 方程中的反应速率常数被扩散系数与 1/2 载体总浓度的乘积取代，这一半正好是运输过程中在任何时刻都可有效利用的载体量（另一半与底物结合形成了复合物）。

文献中已介绍了若干促进扩散的定性机制。其中一些包括载体分子的实际运输，正如本例所描述的情况。其它机制描述了载体是穿越整个膜的蛋白质，因此是相对固定的。在后一

种情况下，小分子通过载体蛋白形成膜内通道进行运输。这种运输机制仍然包括一些前面提到过的底物-载体蛋白结合的一些形式。然而，除非包括一个慢速步骤，否则不可能得到饱和型动力学。该慢速步骤在性质上可以是扩散步骤或是反应步骤，其在整个运输过程中是一个关键步骤。仅靠平衡过程（这里，载体蛋白分子结合底物，并立即将其运送到胞内处于另一平衡态的反应中）不足以描述实验上观察到的饱和型运输速率方程。

2.2.3 主动运输

主动运输类似于协助扩散，因为其也是通过称为通透酶的特定膜定位蛋白来促进该运输过程。与协助扩散相反，主动运输可以逆着浓度梯度的方向进行，因此是一个消耗自由能的过程。运输过程中需要的自由能可由 ATP 中的高能磷酸键提供（初级主动运输）。另外，这个运输过程可以与另一个顺着浓度梯度进行的运输过程相耦合（次级主动运输），后一过程中净生成的自由能与驱动主动运输过程中的自由能消耗相平衡。最后，在一种称为基团转位的特别主动运输过程中，所运输的化合物被转化成为一个衍生物（磷酸化的衍生物），这种衍生物不能反向通过膜来运输。

一组重要的初级主动运输体系是一些 ATP 酯酶，它涉及到需要消耗 ATP 的质子分泌。一些这样的酶可在两个方向上起作用，因而在有质子输入时就会生成 ATP，在原核生物的氧化磷酸化过程中这是非常重要的组成部分（见 2.3.3 节）。还存在其它的初级主动运输体系，该体系包括特定的结合蛋白，其结合要传递的化合物并将它传递到相容的膜结合复合物（Moat 和 Foster，1995）。这种传递触发 ATP 水解，进而导致膜小孔打开使得底物单向扩散进细胞质。在大肠杆菌中通过这些起交通运输作用的 ATP 酯酶所运输的物质有：组氨酸、麦芽糖、阿拉伯糖和半乳糖（Moat 和 Foster，1995）。

在次级主动运输过程中，化合物的运输是顺着有利的浓度梯度方向与另一个化合物耦联运输的。如果这两种化合物沿同一物理方向进行运输，这种运输就叫同向运输，例如质子同向运输，这是次级主动运输中最重要的一种机制。如果化合物沿相反的物理方向进行运输，则称为反向运输。对于质子同向运输，输入的质子必须借助于 ATP 酯酶再运输出去以维持胞内的 pH（见图 2.3）。即使质子同向运输是最普通的次级主动运输，Na^+、K^+ 和 Mg^{2+} 也可以进行同向运输或反向运输。

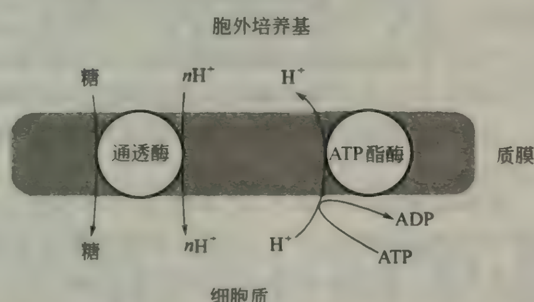


图 2.3　糖类通过质子的同向运输

特定的膜结合通透酶将糖类运输进入细胞，整个过程由 n 个质子同时运输来驱动。对于大肠杆菌（*E.coli*）中的乳糖通透酶，$n=1$（Stein，1990），而且对于大多数其它的糖通透酶可能也是这样。为了将细胞内的 pH 维持在一个恒定的水平，质子必须被运输出细胞。在厌氧细菌中，须通过电子传递链实现，而在真菌中，在细胞膜上的腺苷三磷酸酯酶的作用下通过消耗 ATP 而完成。对于几种真核微生物，包括 *N.crassa*（Perlin et al，1986）和 *S.cerevisiae*（Malpartida and Serrano，1981），细胞膜腺苷三磷酸酯酶的 H^+/ATP 化学计量比为 1。在一定的胞外范围内，胞内通常相当稳定，并通常高于胞外的 pH（Cartwright et al，1989）

在基团转位中，运输过程都伴随有被运输物质的进一步转化。基团转位系统最好的例证是磷酸转移酶系统（PTS），通过这个系统可使某些糖类物质运输进细菌中。这个系统相当复杂，包括至少有四种不同蛋白的参与，这些蛋白质作为高能磷酸基团的磷酸载体把磷酸烯醇丙酮酸（PEP）上的磷酸基团转移给进来的糖（见图 2.4）。

这些蛋白有两种是可溶的细胞质蛋白酶Ⅰ和组氨酸蛋白（HPr），它们分别由大肠杆菌中的 *ptsI* 和 *ptsH* 所编码。这两种蛋白对所有的 PTS 糖类来说是共同的，因此被称为通用的 PTS 蛋白。相反酶Ⅱ对糖是具有特异性的，它具有三个结构域（A，B，C），这三个结构域可以结合成一个单个膜结合蛋白或分裂成两个或多个蛋白 EⅡA，EⅡB 和 EⅡC。在 PTS 系统中 PEP 的磷酸基团通过 EⅠ、HPr、EⅡA 和 EⅡB 的磷酸化中间物传递给进来的糖。EⅡ（EⅡC 蛋白）的 C 域形成转位的通道及至少一部分特定的糖结合位点。基于序列同源性，EⅡ蛋白可归为四类：甘露醇、葡萄糖、甘露糖和乳糖（Moat Foster，1995）。

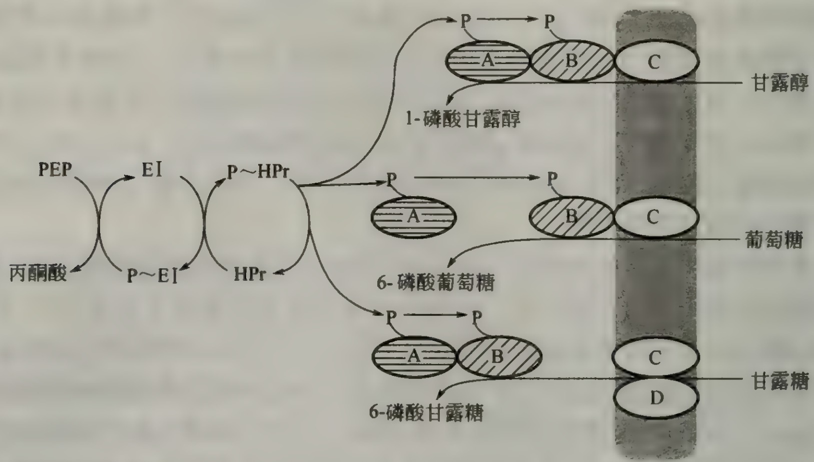


图 2.4 磷酸转移酶系统（PTS）的组织

EⅠ和 HPr 是所有磷酸转移酶系统的普通蛋白，此合成却需要许多专一的 EⅡ蛋白。在图中 A、B、C 三步都要用到 EⅡ蛋白，此处的 EⅡ蛋白可能被联入一个单一的膜结合蛋白（如图中所示的甘露醇磷酸转移酶系统），也可能分解为两个或多个蛋白。在葡萄糖磷酸转移酶系统中，B、C 两步需要引入ⅡBC 蛋白，采用的是膜结合形式，但第 A 步是可溶的。在甘露磷酸转移酶系统，第 A、B 两步需引入可溶性蛋白ⅡAB，但 C 步采用的是膜结合形式

主动运输过程中的 ATP 消耗在细胞生物合成全部 ATP 消耗中占重要部分（见 2.6）。在质子同向运输的过程中，ATP 消耗依赖于运输过程的化学计量关系和质子重新输出的化学计量关系。研究得最透彻的体系是大肠杆菌中的乳糖渗透酶，其同时运输一个质子和一个乳糖（见图 2.3）。对许多其它物质的运输相似的化学计量比也成立，例如原核生物和真核生物中许多氨基酸的运输以及丝状真菌中通过高度亲和系统对葡萄糖、果糖和半乳糖等的运输（见表 2.2）。原核生物和真核生物中质子的重新输出过程有一些不同之处。在好氧细菌中，电子传递链位于细胞质膜，质子可通过电子传递链从胞液中重新运输出去（见 2.3.3）。然而，质子还可由 F_0F_1-ATP 酯酶再转运至胞外。ATP 酯酶在原核生物中位于细胞质膜，它主要涉及氧化磷酸化过程中 ATP 的合成，但它是可逆的，并可以在消耗 ATP 的情况下将质子泵出细胞外。目前还不能准确知道 F_0F_1-ATP 酯酶的化学计量比，但在大肠杆菌中通常使用的化学计量比是 $2H^+/ATP$。在真核生物中，F_0F_1-ATP 酯酶位于线粒体中，但其也具有属于另一类 ATP 酯酶的质膜 ATP 酯酶。这种 ATP 酯酶可能只在 ATP 水解方向起作用，通常其化学计量比为 H^+/ATP。利用前面的化学计量学，有可能计算出通过主动运输运送不同物质时的 ATP 消耗，表 2.2 总结了其结果。

表 2.2 细菌和真菌中一些化合物的主动运输概述

种 类	含有化合物	机 理	消耗 ATP 量
细菌	氨基酸	H^+ 同向运输	0.5
	葡萄糖酸盐(或酯)	H^+ 同向运输	0.5
	有机酸	H^+ 同向运输	0.5
	磷酸盐	H^+ 同向运输	0.5
	糖	H^+ 同向运输	0.5
		PTS	0①
真菌	氨基酸	H^+ 同向运输	1
	NH_4^+	化学渗透	1
	磷酸盐	H^+ 同向运输，Na^+ 反相运输	2
	糖	H^+ 同向运输	1
		促进扩散	0
	硫酸盐	Ca^{2+} 和 H^+ 同向运输	1

① 通过磷酸转移酶系统糖在运输过程中被磷酸化。即使在磷酸烯醇丙酮酸中出现一个高能的磷酸基团，在糖的磷酸化过程中高能磷酸键的能量并不释放，因此 ATP 能耗为 0。

2.3 供能反应

供能反应用于三种目的：(1) 主要以 ATP 的形式生成吉布斯自由能，给其它细胞反应提供能量；(2) 主要以辅助因子 NADPH 的形式生成生物合成反应所需的还原力（或还原当量)；(3) 生成生物合成结构单元所需的代谢前体物。在结构单元生物合成中提供碳骨架的底物通常被称为碳源，而提供生物合成所需吉布斯自由能和还原力的底物称为能源。许多底物既作为碳源又作为能源，像工业生产中常用的底物情况，如葡萄糖、果糖、半乳糖、乳糖、蔗糖和麦芽糖等糖类物质。糖类代谢始于糖酵解，末端产物为丙酮酸。然后，丙酮酸进入发酵途径、回补途径、用于氨基酸合成的转氨途径、三羧酸循环或其它途径而进一步加工。生物合成结构单元所需全部前体代谢物都是由糖酵解和 TCA 循环生成的，但为了补充这些生物合成所消耗的前体代谢物，还需要一组回补途径。在工业培养基中（如糖蜜、玉米浆)，还常常存在着额外的碳源和能源，如氨基酸、有机酸或脂肪，当存在一种糖或单一的碳源和能源时，许多生物具有代谢这些物质的能力。

由于供能途径在中心碳代谢和生物合成中的重要性，我们将在本节介绍糖酵解、发酵、回补等几种途径，还有 TCA 循环、氧化磷酸化以及脂肪、油类和有机酸代谢的一些基础知识。

2.3.1 糖酵解

糖酵解是将葡萄糖转化成丙酮酸的所有生化反应的总和。糖酵解由多个途径（或代谢路线）来完成。最常遇到的途径有：(1) 糖酵解途径 (EMP)；(2) 戊糖磷酸途径 (PP)；(3) Entner-Doudoroff 途径 (ED)。糖类进入糖酵解途径的常见入口是通过三种单磷酸己糖进入酵解途径，即 1-磷酸葡萄糖 (G1P)，6-磷酸葡萄糖 (G6P) 和 6-磷酸果糖 (F6P)，三者之间很容易通过葡萄糖磷酸变位酶（对 G1P 和 G6P）和磷酸己糖异构酶（对 G6P 和 F6P）而相互转化。这些酶一般都过量存在，在这种条件下，这三种化合物处于一种平衡状态并构成一个单独的代谢库。这个代谢库可通过生成三种组分中的任何一种而得到补充（见图 2.5)，而且在平衡时，这个库中约 3% 为 1-磷酸葡萄糖，65% 为 6-磷酸葡萄糖，32% 为 6-磷酸果糖 (Zubay，1988)。

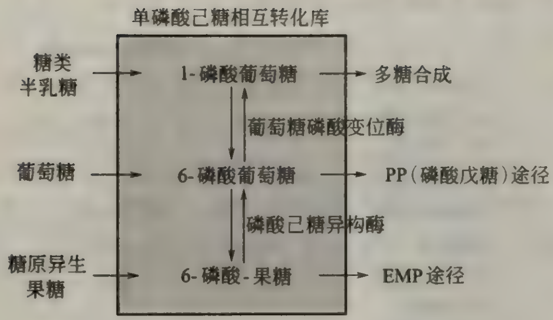


图 2.5 单磷酸己糖库及其在不同途径中的作用

1-磷酸葡萄糖由所存储的碳水化合物磷酸化形成或是 Leloir 代谢中乳酸同化的最终产物，用于多糖的合成。6-磷酸葡萄糖由葡萄糖消耗 ATP 磷酸化形成，用于 PP 途径（或 ED 途径）。6-磷酸果糖由糖原异生或由果糖消耗 ATP 磷酸化形成，用于 EMP 途径。因此，单磷酸己糖在代谢途径中既是起点也是终点

胞内的葡萄糖和果糖通过 6 位上的碳的磷酸化作用直接进入单磷酸己糖库。在细菌中，糖类主要通过 PTS 系统被吸收，磷酸化作用与转运同时进行，而在真核生物内，磷酸化作用是由己糖激酶催化的。在酿酒酵母中有三种不同的酶参与葡萄糖和果糖的磷酸化：即己糖激酶 A、己糖激酶 B 和葡萄糖激酶（Gancedo 和 Serrano，1989）。两种己糖激酶可使葡萄糖和果糖两者磷酸化，而葡萄糖激酶只特异性地作用于葡萄糖。来自胞外的半乳糖或胞内水解生成的半乳糖，以一种更复杂的方式进入单磷酸己糖库。如果半乳糖由质子驱动通透酶进行运输，则通过 Leloir 途径进行磷酸化作用。这里半乳糖在 C-1 位置上进行磷酸化，然后与 UDP-葡萄糖进行反应，生成 1-磷酸葡萄糖和 UDP-半乳糖。UDP-半乳糖可通过其它的反应使 UDP-葡萄糖再生。如果半乳糖通过 PTS 系统进行运输，则在 C-6 位置上进行磷酸化并经塔格糖途径进行代谢，其中 6-磷酸半乳糖转化成 6-磷酸塔格糖，并在消耗一个 ATP 的条件下进一步磷酸化生成 1,6-二磷酸塔格糖，最后 1,6-二磷酸塔格糖裂解成磷酸二羟丙酮和 3-磷酸甘油醛。

在 EMP 途径中，1mol 6-磷酸果糖转化成 2mol 丙酮酸（见图 2.6）。其中一个反应，即 6-磷酸果糖转化成 1,6-二磷酸果糖的反应，需要以 ATP 形式存在的自由能，但在 EMP 途径中每分解 1mol 6-磷酸葡萄糖总计获得 3mol ATP。在图 2.6 的反应（6）（即 3-磷酸甘油醛氧化生成 1,3-二磷酸甘油酸酯的反应）还产生了 NADH。因此通过 EMP 途径葡萄糖转化成丙酮酸的总化学计量式为

$$\underset{\text{(丙酮酸)}}{2\text{pyruvate}} + 2\text{ATP} + 2\text{NADH} + 2H_2O + 2H^+ - \underset{\text{(葡萄糖)}}{\text{glucose}} - 2\text{ADP} - 2\sim P - 2\text{NAD}^+ = 0 \quad (2.2)$$

在 PP 途径中，6-磷酸葡萄糖氧化生成 6-磷酸葡萄糖酸，并进一步转化成 5-磷酸核酮糖和二氧化碳（见图 2.6）。在这两个反应中，进入途径的每 1mol 6-磷酸葡萄糖各生成 1mol NADPH。接下去，5-磷酸核酮糖转化生成 5-磷酸核糖和 4-磷酸赤藓糖，它们都是结构单元（如芳香族氨基酸和核苷酸等）生物合成的前体物。通过不同的反应次序，5-磷酸核酮糖反过来还可转化成 6-磷酸果糖和 3-磷酸甘油醛，从而再进入 EMP 途径（见图 2.6）。

PP 途径中的各步反应分别如下：

$$\underset{\text{(6-磷酸葡萄糖酸)}}{\text{6-P-gluconate}} + \text{NADPH} + H^+ - \underset{\text{(6-磷酸葡萄糖)}}{\text{glucose-6-P}} - \text{NADP}^+ - H_2O = 0 \quad (2.3a)$$

$$CO_2 + \underset{\text{(5-磷酸核酮糖)}}{\text{ribulose-5-P}} + \text{NADPH} + H^+ - \text{6-P-gluconate} - \text{NADP}^+ - H_2O = 0 \quad (2.3b)$$

$$\underset{\text{(5-磷酸核糖)}}{\text{ribose-5-P}} - \text{ribulose-5-P} = 0 \quad (2.3c)$$

$$\underset{\text{(5-磷酸木酮糖)}}{\text{xylulose-5-P}} - \text{ribulose-5-P} = 0 \quad (2.3d)$$

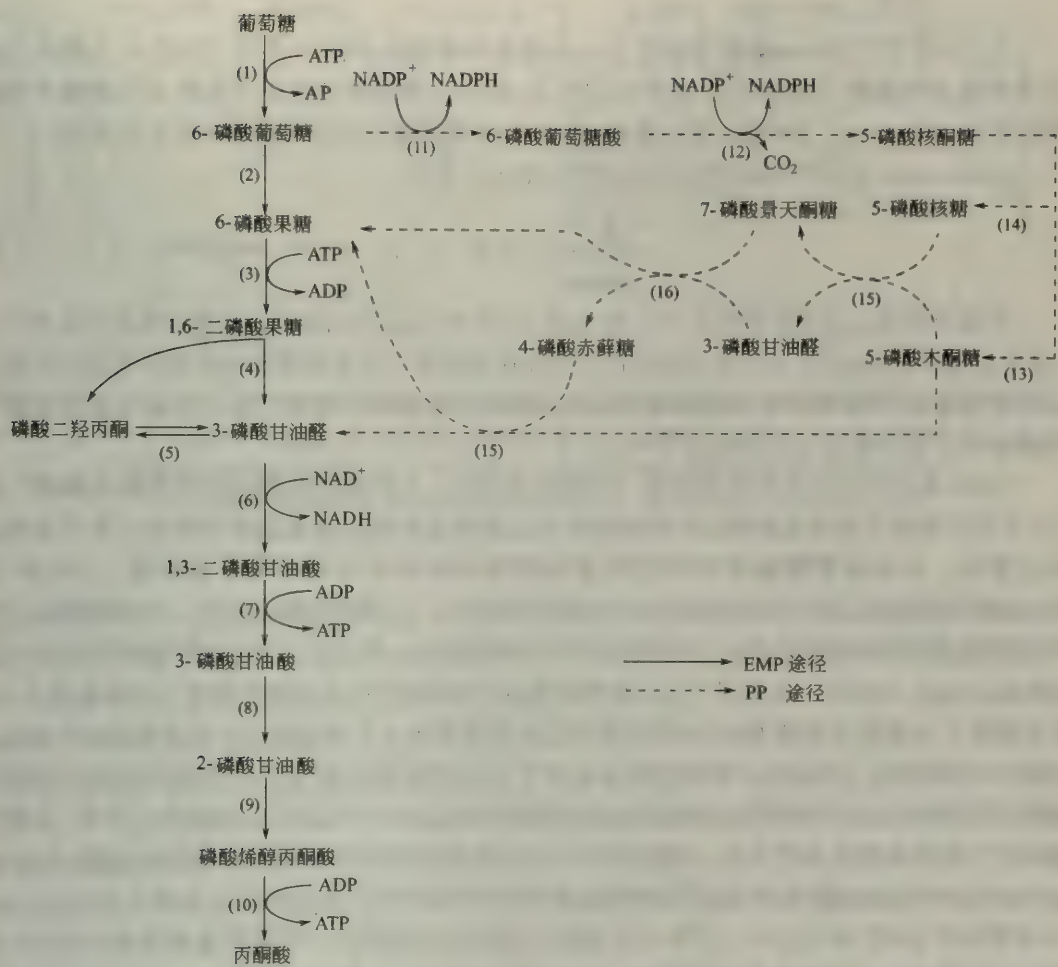


图 2.6 真菌中的 EMP 途径和 PP 途径

（1）己糖激酶；（2）磷酸己糖异构酶；（3）磷酸果糖激酶；（4）醛缩酶；（5）磷酸甘油醛异构酶；（6）3-磷酸甘油醛脱氢酶；（7）3-磷酸甘油酸激酶；（8）3-磷酸甘油酸变位酶；（9）烯醇酶；（10）丙酮酸激酶；（11）6-磷酸葡萄糖脱氢酶；（12）6-磷酸葡萄糖脱氢酶；（13）二磷酸核酮糖 3-差向异构酶；（14）二磷酸核酮糖异构酶；（15）转羟乙醛酶；（16）转二羟丙酮基酶

glyceraldehyde-3-P + sedoheptulose-7-P − xylulose-5-P − ribose-5-P = 0　　(2.3e)

（3-磷酸甘油醛）　（7-磷酸景天酮糖）

fructose-6-P + erythrose-4-P − sedoheptulose-7-P − glyceraldehyde-3-P = 0　　(2.3f)

（6-磷酸果糖）　（4-磷酸赤藓糖）

fructose-6-P + glyceraldehyde-3-P − xylulose-5-P − erythrose-4-P = 0　　(2.3g)

PP 途径的总反应计量式取决于如下两种情况：进入 PP 途径的碳再循环进入 EMP 途径氧化成二氧化碳(同时生成还原力 NADPH)，或消耗于生成生物合成前体物(如五碳糖用于合成核糖核苷酸)。PP 途径也因此被认为具有氧化和回补功能，分别用总计量式描述如下。

回补 PP 功能：

6ribose-5-P + 5ADP + 4H_2O + 4～P − 5glucose-6-P − 5ATP = 0　　(2.4)

（5-磷酸核糖）　（6-磷酸葡萄糖）

氧化 PP 功能：

$$12NADPH + 12H^+ + 6CO_2 + \sim P - glucose\ 6\text{-}P - 12NADP^+ - 7H_2O = 0 \qquad (2.5)$$

在 ED 途径中，6-磷酸葡萄糖酸在 6-磷酸葡萄糖酸脱水酶的作用下转化成 2-酮基-3-脱氧-6-磷酸葡萄糖酸（KDPG），接着 KDPG 在 KDPG 醛缩酶的作用下裂解成 3-磷酸甘油醛和丙酮酸（Conway，1992）。因此通过 ED 途径将葡萄糖转化成丙酮酸的总反应式为：

$$\underset{\text{(丙酮酸)}}{2pyruvate} + ATP + NADPH + NADH + 2H_2O + 2H^+ - \underset{\text{(葡萄糖)}}{glucose} - ADP - 1\sim P - NAD^+ - NADP^+ = 0 \qquad (2.6)$$

需指出的是：在 ED 途径中只生成 1mol ATP 和 1mol NADPH，而糖酵解途径是其 2 倍(其中生成的是 NADH 而不是 NADPH)。ED 途径还有一个非磷酸化途径的相当途径，其中葡萄糖酸通过 2-酮-3 脱氧-葡萄糖酸转化成丙酮酸和甘油醛，但这个途径只有当细胞代谢葡萄糖酸时才是活跃的（Conway，1992)。

EMP 途径中的三个中间代谢物（3-磷酸甘油醛，3-磷酸甘油酸和磷酸烯醇丙酮酸）和 PP 途径中的两个中间代谢物（5-磷酸核糖和 4-磷酸赤藓糖）是氨基酸和核酸生物合成的前体代谢物。这两条糖酵解途径的相对通量的大小取决于对于吉布斯自由能、NADH 和 NADPH 形式的还原力以及前面的前体代谢物的需求。已经用实验方法对一些生物测定了两条糖酵解途径间的通量分布，如利用所谓的呼吸测量法，测定标记^{14}C 的葡萄糖形成的$^{14}CO_2$ (Blumenthal，1965)，或利用 NMR 来测量胞内代谢物中^{13}C 的富集度分数（见第 9 章)。表 2.3 列出了一些微生物的 EMP 和 PP 途径上的通量分布。大多数研究结果表明 EMP 途径是主要的代谢途径，然而对于那些产物合成需要 NADPH 而过量生产代谢物的微生物，例如用谷氨酸棒杆菌生产赖氨酸，PP 途径上的通量可能大于 EMP 途径上的通量（见第 10 章)。通过 PP 途径通量的相对大小一般取决于比生长速率和培养基组成。在稳态恒化器中，*Aspergillus nidulans* 胞内 PP 途径的相对通量随稀释速率的增加而增加 [见图 2.7 (a)]，这与观察到的 EMP 途径上的一个酶（醛缩酶）相对活性的减小（当稀释速率增加）和 PP 途径上的一个酶（6-磷酸葡萄糖脱氢酶）相对活性的增加是一致的 [见图 2.7 (a)] (需指出的是，上述两种酶的相对活性是通过相应于提供 EMP 和 PP 途径全部碳源的己糖激酶的活性而测定的)。在高比生长速率下，PP 途径活性的增加可以认为是由于在高比生长速率下，细胞对 PP 途径上生成的 NADPH 和前体代谢物需求的增加，尤其是 RNA 生物合成对 5-磷酸核糖需求的增加 [见图 2.7 (b)]。然而，应当指出，这样一个通量与酶活性测量之间的对应关系并不能普遍发现，因为后者是指体外确定的 v_{max}测量值，由于酶的调控或某一特定途径参与整个代谢过程的不确定程度，这个值可能与胞内的活性完全不同。

表 2.3　不同种类微生物中 EMP 途径和 PP 途径上的相对通量分布/%

种　类	EMP	PP	条　件	参考文献
A. niger	78		间歇培养	Shu et al(1954)
C. glutamicum	32	66	恒化器培养	Marx et al(1996)
P. chrysogenum	77	23	间歇培养	Wang et al(1958)
	56～70		间歇培养	Lewis et al(1954)
P. digitatum	83	17	间歇培养	Wang et al(1958)
	77	23	间歇培养	Reed and Wang(1959)

EMP 途径和 PP 途径的主要控制位点处于途径的那些入口处，即分别在磷酸果糖激酶和 6-磷酸葡萄糖脱氢酶催化的反应处(Zubay，1988)。6-磷酸葡萄糖脱氢酶受 $NADPH/NADP^+$

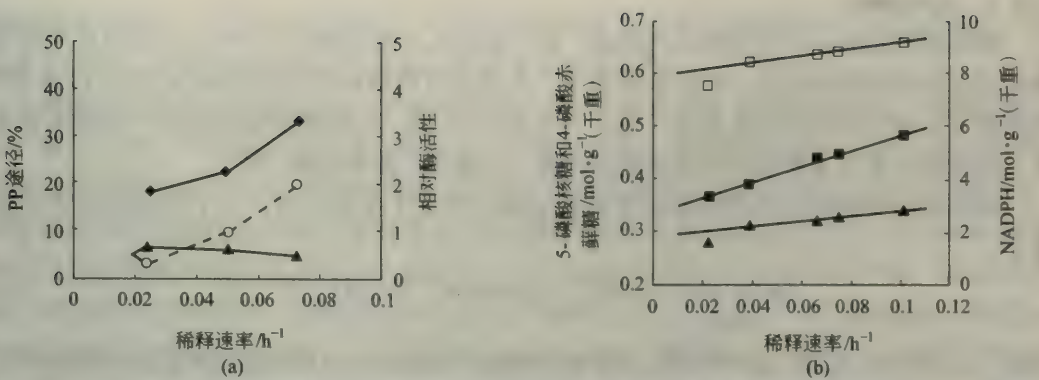


图 2.7　葡萄糖受限的连续培养中，PP 途径上的相对通量随稀释速率的变化

（a）*A. nidulans* 菌 PP 途径上的相对通量（◆），由呼吸方法测定。同时标出糖酵解酶醛缩酶的相对酶活性（▲），PP 途径中 6-磷酸葡萄糖脱氢酶与己糖激酶的相对活性（○）。己糖激酶的活性随着生长速率的增加成线性增加（数据引自 Carter 和 Bull，1969）

（b）考察 *P. chrysogenun* 菌的生长速率，计算所得的 NADPH 需求量（□），5-磷酸核糖的需求量（■），4-磷酸赤藓糖的需求量（▲）（数据引自 Nielsen，1997）

的比值来调节，而磷酸果糖激酶是一个复杂的别构酶，它有几个效应物。在酿酒酵母中，此酶受 AMP、氨、磷酸以及 2,6-二磷酸果糖（ATP 存在下，6-磷酸果糖经磷酸化而生成的一个代谢调节物）激活，被 ATP 抑制（Gancedo 和 Serrano，1989)。与 ATP 的结合会导致酶对 6-磷酸果糖亲和力的降低，而与调节物 2,6-二磷酸果糖的结合会导致酶对 6-磷酸果糖亲和力的极大增加（Zubay，1988)。因此 2,6-二磷酸果糖对于 EMP 途径上的通量具有促进作用，而 ATP 具有抑制作用。这种调节状况能使磷酸果糖激酶的活性增加以适应增加着的 6-磷酸果糖的浓度（这也导致 2,6-二磷酸果糖水平的提高)；然而在高能荷水平下，由于抑制着的磷酸果糖激酶活性而使 ATP 的生成进一步被阻断。磷酸果糖激酶的这种关键作用成为分析复杂代谢途径中的一个中心点（见第 12 章)。

在细胞代谢中，辅助因子 NADH 和 NADPH 用于两种不同的目的。在好氧微生物中，NADH 主要涉及通过氧化磷酸化反应生成吉布斯自由能（见 2.3.3 节)，而 NADPH 主要用于结构单元的生物合成（见 2.4 节)。因此，NAD^+ 作为供能反应的底物，而 NADPH 用做生物合成反应的底物，因而 $NADH/NAD^+$ 及 $NADPH/NADP^+$ 这些比值在不同的水平上被调节着。在细菌中，$NADH/NAD^+$ 为 0.03～0.08，$NADPH/NADP^+$ 为 0.7～1.0（Ingraham 等，1983)。在酵母中这两个比值分别为 0.25～0.30 和 0.58～0.75。然而，这两种辅酶可在烟酰胺核苷酸转氢酶的作用下相互转化，它通过下面的反应进行催化实现氢在 NAD^+ 和 $NADP^+$ 之间的转移。

$$NADH + NADP^+ - NAD^+ - NADPH = 0 \qquad (2.7)$$

这种酶存在于细菌和哺乳动物细胞中（Hoek 和 Rydstrom，1988)，而在酵母（Lagunas 和 Gancedo，1973；Bruinenberg，1985）和丝状真菌中（Eagon，1963）还未被确认。在哺乳动物细胞中，这个酶位于线粒体内膜上，在这里其提供了一个机制，使得转氢反应与在线粒体膜上的其它与能量相关的反应得以联系（Hoek 和 Rydstrom，1988)。这种酶的生理作用还不知道，但是它能对细胞的氧化还原力或线粒体能量供应的消耗提供一种保护性的缓冲作用。一般来讲，在正常生长条件下，即使这种酶存在，但其在总的细胞代谢中可能不会起到重要的作用。

2.3.2 发酵途径

糖酵解的最后一个代谢物是丙酮酸，它可通过几条途径被进一步转化，这取决于细胞的氧化还原作用和能量状态。在好氧生物中，大多数丙酮酸经过乙酰辅酶 A 进入 TCA 循环，进而被完全氧化成二氧化碳和水（见 2.3.3 节）。然而，在氧受限制的条件下或在厌氧生物中，丙酮酸可通过发酵途径转化成诸如乳酸、乙酸和乙醇等代谢产物。

最简单的发酵途径是丙酮酸在乳酸脱氢酶的作用下生成乳酸，这个反应的化学计量式如下。

$$\underset{(\text{乳酸})}{\text{lactic acid}} + NAD^+ - \text{pyruvate} - NADH - H^+ = 0 \tag{2.8}$$

在式（2.8）中，EMP 途径中氧化 3-磷酸甘油醛所生成的 NADH 被用来还原丙酮酸而生成乳酸，因此，在葡萄糖转化成乳酸过程中并没有净生 NADH。在高等真核生物中，如肌肉

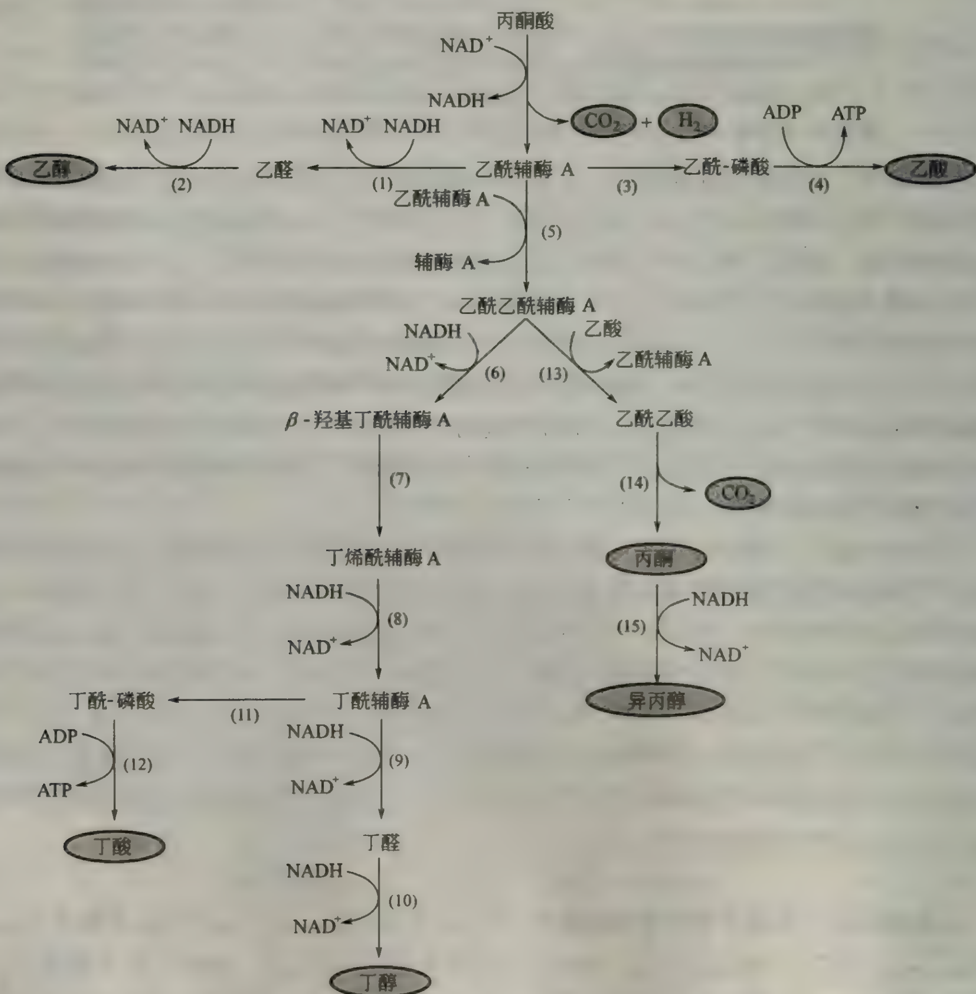


图 2.8 丙酮丁醇梭状芽孢杆菌的混合发酵

（1）乙醛脱氢酶；（2）乙醇脱氢酶；（3）磷酸乙酰基转移酶；（4）乙酸激酶；（5）乙酰辅酶 A 乙酰转移酶；（6）L(+)-β-羟基丁酰辅酶 A 脱氢酶；（7）1,3-二羟酰辅酶 A 脱氢酶；（8）丁酰辅酶 A 脱氢酶；（9）丁醛脱氢酶；（10）丁醇脱氢酶；（11）磷酸丁酰基转移酶；（12）丁酸激酶；（13）辅酶 A 转移酶；（14）乙酰乙酸脱羧酶；（15）异丙醇脱氢酶

细胞在缺氧条件下这个途径是活跃的。在许多细菌中这个途径也是活跃的。在乳酸菌中，该途径是主要的，而且在某种情况下是惟一活跃的发酵途径[1]。

在乳酸菌中还存在着其它的一些发酵途径，这会形成几种不同的代谢产物，除乳酸外，还有乙酸、乙醇、甲酸和二氧化碳（见例 8.3 对乳酸菌混合酸发酵的分析）。在大肠杆菌中，在厌氧条件下反应式（2.8）是很重要的，但在混合酸发酵中它总是与其它的途径一同存在，从而生成几种不同的代谢产物（见例 3.1，对大肠杆菌混合酸发酵的分析）。革兰阳性菌梭状菌属具有复杂的发酵代谢途径（见图 2.8），从而能生成许多不同的代谢产物。该菌属中丙酮丁醇梭状芽孢杆菌是一种最重要的工业生产菌株。图 2.8 表明，除乙酰辅酶 A 转化成乙醇和乙酸外，两个乙酰辅酶 A 分子可以反应生成乙酰乙酰辅酶 A。这个化合物可依次通过三个反应生成丁酰辅酶 A（见图 2.8）。同乙酰辅酶 A 转化成乙酸和乙醇类似，丁酰辅酶 A 可分别经丁酰磷酸和丁醛生成丁酸和丁醇。另外，在另一分支途径中，乙酰乙酸可脱羧生成丙酮，并可进一步还原为异丙醇。

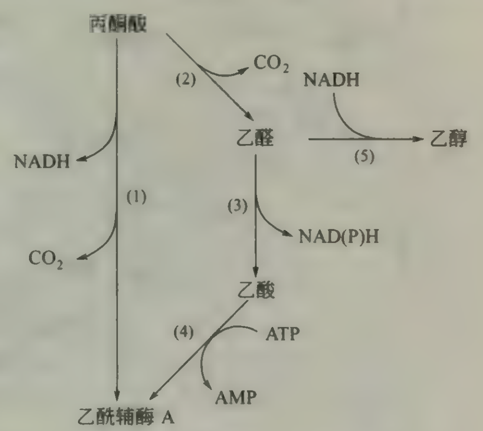


图 2.9 酵母菌的发酵代谢

（1）丙酮酸脱氢酶；（2）丙酮酸脱羧酶；（3）乙醛脱氢酶；（4）乙酰辅酶 A 合成酶；（5）乙醇脱氢酶

反应（1）在线粒体中进行，其它反应在细胞质中进行

酵母的发酵代谢与细菌的有些不同，其主要的最终产物为乙醇，因此也称该过程为酒精发酵，然而此过程也生成一些乙酸和少量的琥珀酸。生成乙醇和乙酸的发酵途径始于丙酮酸脱羧生成乙醛，乙醛再由乙醇脱氢酶还原生成乙醇或被氧化生成乙酸（见图 2.9）。酵母发酵代谢与细菌发酵的主要不同在于它不经过乙酰辅酶 A 来进行。已经确认了乙醇脱氢酶的四种同功酶（ADH Ⅰ，ADH Ⅱ，ADH Ⅲ，ADH Ⅳ）。在以葡萄糖为基质的厌氧生长中，细胞质 ADH Ⅰ 是组成型表达的，并负责生成乙醇。ADH Ⅱ 是细胞质中的蛋白并受葡萄糖阻遏，而且主要与以乙醇为底物的好氧生长有关。线粒体 ADH Ⅲ 也是受葡萄糖阻遏的，其功能未知，但它可能在平衡胞质溶胶和线粒体的氧化还原电势中起穿梭作用（Nissen 等，1997）。已经确认了两种乙醛脱氢酶的同功酶，其中一个可以利用 NAD^+ 和 $NADP^+$ 二者为辅因子，而另一个同功酶只能特异性地利用 $NADP^+$ 为辅因子。因此，乙酸的形成会导致 NADPH 的形成，这可能是酵母中 NADPH 供应的重要来源。

在酿酒酵母利用葡萄糖转化为乙醇的整个过程中，没有 NADH 的净生成。然而，由于前体代谢物以及生物合成所需结构单元的合成过程中会引起 NADH 的净生成（例如从葡萄糖每生成一个丙酮酸会生成一个 NADH），细胞需要一个代谢途径来消耗所产生的过剩的 NADH。一个这样的可能性就是利用磷酸二羟丙酮（DAP）生成甘油。此途径的总反应式如下。

$$\underset{\text{(甘油)}}{\text{glycerol}} + NAD^+ + \sim P - DAP - NADH - H^+ = 0 \qquad (2.9)$$

[1] 如果乳酸脱氢酶催化的反应是惟一活跃的途径，那么此代谢通常称为同型发酵。

从葡萄糖生成甘油的总过程中会净消耗 NADH，因此上述途径可以对如下几种过程进行补偿：在前体代谢物和结构单元合成过程中产生 NADH，但在生物合成中没被利用的过程或其它需要 NADPH 的反应过程。

2.3.3 TCA 循环和氧化磷酸化

丙酮酸完全氧化的第一步是生成乙酰辅酶 A 的氧化脱羧反应（见图 2.10），这个反应是一系列复杂反应的结果，由总称为丙酮酸脱氢酶复合物（PDC）的一组三种酶来催化完成。在真核细胞中，和其它所有与丙酮酸的好氧分解代谢反应有关的酶一样，这个酶复合物位于线粒体上。在丙酮酸的氧化反应中，辅酶 NAD^+ 作为电子受体。

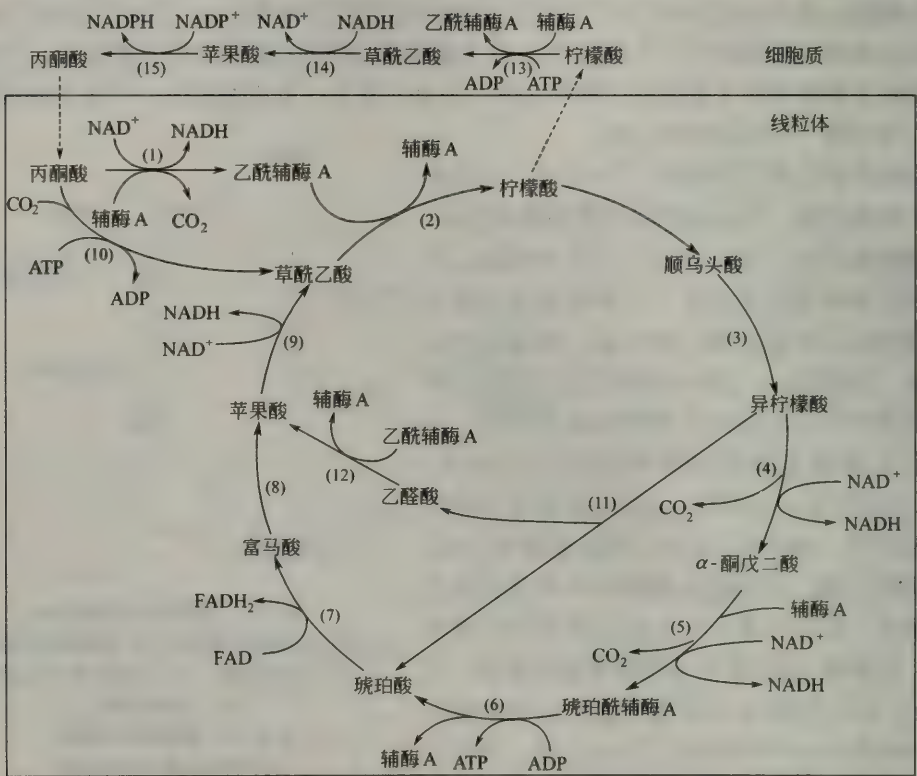


图 2.10 真菌体内的 TCA 循环和回补途径

(1) 丙酮酸脱氢酶复合物；(2) 柠檬酸合成酶；(3) 顺乌头酸酶；(4) 异柠檬酸脱氢酶；(5) α-酮戊二酸脱氢酶；(6) 琥珀酸硫激酶；(7) 琥珀酸脱氢酶；(8) 延胡索酸酶；(9) 苹果酸脱氢酶；(10) 丙酮酸羧化酶；(11) 异柠檬酸裂解酶；(12) 苹果酸合成酶；(13) ATP-柠檬酸裂解酶；(14) 苹果酸脱氢酶；(15) 苹果酶。在真核细胞中，丙酮酸脱氢酶复合物与膜结合，因此，丙酮酸转化为乙酰辅酶 A 是和丙酮酸向线粒体的运输相关联的（在线粒体膜上没有丙酮酸的载体）。而且，乙醛酸等循环的反应由酶 (2)、(3)、(11)、(12) 和 (9) 催化，反应不是在线粒体中进行（如图所示），而是在乙醛酸循环体中进行的，由乙酰辅酶 A 转化为琥珀酸的合成也是在此处进行。琥珀酸在乙醛酸循环中形成，然后运输到线粒体中，由此进入 TCA 循环。在原核细胞中，在胞液中发生的 TCA 不是有组织的，不存在 (13)、(14) 和 (15)

碳进入 TCA 循环是通过乙酰辅酶 A 与草酰乙酸在柠檬酸合成酶的催化下缩合生成柠檬酸的反应而发生的（见图 2.10）。柠檬酸随后在乌头酸酶的作用下生成其异构体——异柠檬酸，这个反应要经过顺乌头酸，它在细胞代谢中没有其它作用，因此在 TCA 循环中不考虑它。柠檬酸转化成异柠檬酸的总平衡常数接近 1，表明等量的柠檬酸和异柠檬酸处于平衡中，这两个代谢产物通常归进一个单独代谢库中。TCA 循环中接下来的两步是氧化脱羧反

应。首先，异柠檬酸在异柠檬酸脱氢酶的作用下生成 α-酮戊二酸。接着，α-酮戊二酸经 α-酮戊二酸脱氢酶催化转化成琥珀酰辅酶 A，该步反应类似于丙酮酸脱氢酶催化的丙酮酸脱羧反应。实际上，这两个酶系使用同样的脱氢酶亚基。在下面的反应中，琥珀酰辅酶 A 水解生成琥珀酸，同时在辅酶 A 酯键水解过程中释放出吉布斯自由能，通过 GDP 磷酸化生成 GTP 而回收这部分自由能。然后琥珀酸脱氢生成延胡索酸，这个反应需要一强氧化剂，FAD 被还原成 $FADH_2$。FAD 整合在琥珀酸脱氢酶黄素蛋白酶中来催化这个反应。延胡索酸在延胡索酸酶的作用下生成 L-苹果酸。最后，L-苹果酸在苹果酸脱氢酶的作用下生成草酰乙酸，从而完成了这个循环。

TCA 循环的主要调节位点在柠檬酸合成酶、异柠檬酸脱氢酶和 α-酮戊二酸脱氢酶。显然这三种酶的活性都偏爱低水平的 $NADH/NAD^+$ 比，但这个比值尤其强烈地影响着异柠檬酸脱氢酶的活性。此外，在酵母中，异柠檬酸脱氢酶受 AMP 激活，受 ATP 抑制（Zubay，1988）。

TCA 循环中丙酮酸完全氧化的总化学计量式如下。

$$3CO_2 + GTP + 4NADH + FADH_2 + 4H^+ - \text{pyruvate} - 3H_2O - GDP - 2{\sim}P - 4NAD^+ - FAD = 0 \qquad (2.10)$$

这样，每氧化 1mol 丙酮酸，就生成 4mol NADH 和 1mol $FADH_2$。很明显，只有当这两种辅助因子被重新氧化生成 NAD^+ 和 FAD 时，TCA 循环才能继续进行。在好氧条件下，通过一个电子受体链把电子从这些辅酶上转移给自由氧。大多数电子受体组成一个大的复合物，镶嵌在原核生物的质膜上和真核生物的线粒体内膜上（见图 2.11）。电子通过电子传递链从 NADH 到氧上的运动是受一个大的负的自由能驱动的，即 $\Delta G^0 = -220\text{kJ}\cdot(\text{mol NADH})^{-1}$，而且该自由能的一部分以 ATP 的形式捕获。Peter Mitchell 1961 年提出的化学渗透理论可以解释这两种完全不同的过程（电子运输和 ATP 合成过程）是如何耦联在一起的（Mitchell，1961；Mitchell 和 Moyle，1965；Senior，1988）。这个理论认为：当电子通过此电子链运输时，质子被泵出线粒体外（或被泵出原核生物的细胞外），因此穿越线粒体内膜（或原核生物的质膜）上形成了 pH 梯度（约 0.05pH 单位，细胞内或线粒体内高些）和电子电势梯度（约 −0.15V）（见图 2.11）。当质子通过 F_1F_0-ATP 酶复合物（或 ATP 合成酶）再进入线粒体基质（或细胞质）中时，就产生了 ATP。对真核生物而言，氧化磷酸化的理论化学计量关系（即所谓的 P/O 比）是每氧化 1mol $NADH_2$ 生成 3mol ATP，或每氧化 1mol 琥珀酸（或 $FADH_2$）合成 2mol ATP（见图 2.11）。对原核生物而言，质子只在两个位点上运输（每个位点两个质子），而且由于原核生物的 F_1F_0-ATP 酯酶的化学计量关系为 $1ATP/2H^+$，所以氧化磷酸化的理论化学计量关系是每氧化 1mol $NADH_2$ 合成 2mol ATP。由于氧化作用和磷酸化作用的不完全耦联，实际上所谓有效的 P/O 比远低于理论值（见例 13.6）。这是由于穿越膜的质子梯度所驱动的外来过程的结果。因此，像在 2.2.3 中讨论过的一样，许多化合物由质子同向运输所驱动，而且这影响着原核生物中穿越质膜的质子梯度。类似地，在真核生物中，线粒体内膜上有磷酸盐、ATP、ADP 以及代谢物丙酮酸、柠檬酸、异柠檬酸、琥珀酸和苹果酸的特异载体，这些化合物的运输也是由质子梯度所驱动的（LaNoue 和 Schoolwerth，1979；Zubay，1988）。

由于线粒体内膜是不能渗透 NADH 的，因此真核生物中细胞质 NADH 的氧化需要运用除 NADH 脱氢酶以外的手段把电子运输到电子传递链上。NADH 脱氢酶是专门作用于线粒体NADH的，为此目的，真菌的线粒体装备有NADH脱氢酶，它位于线粒体内膜的外表

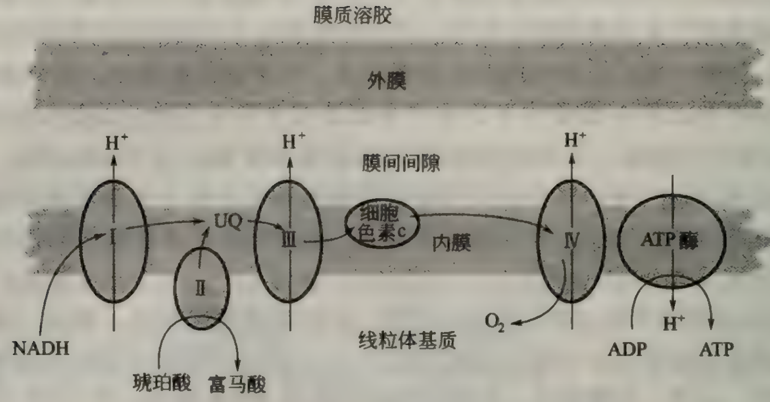


图 2.11　真核生物的电子传递链和氧化磷酸化

通过电子传递链，电子从 NADH 或琥珀酸传给氧气。电子传递链基本单元以较大复合物的形式位于线粒体内膜。来自 NADH 的电子首先传给复合物Ⅰ，即 NADH 脱氢酶，它是含有黄素单核苷酸的黄素蛋白。来自琥珀酸的电子首先转给 FDA，然后在复合物Ⅱ，即琥珀酸脱氢酶中进行整合（TCA 中的酶之一）。来自复合物Ⅰ和复合物Ⅱ（或来自位于线粒体内膜的其它黄素蛋白）的电子传给辅酶 Q（UQ），UQ 可以在脂质膜中自由扩散。电子从 UQ 传给细胞色素系统。首先，电子传给复合物Ⅲ，它包含两个 b 型细胞色素（b566 和 b562）和细胞色素 c1。然后，电子通过细胞色素 c 传给复合物Ⅳ（或细胞色素氧化酶），复合物Ⅳ包括细胞色素 a 和 a_3，最后，电子传给氧气。复合物Ⅰ、复合物Ⅲ和复合物Ⅳ穿越细胞质内膜，当这些复合物运输两个电子时，每种复合物向膜间空间中释放四个质子。这些电子将被质子传导的 ATP 合成酶（或 F_1F_0ATP 酯酶复合物）运输回线粒体基质。在这个复合物中，运输三个质子会产生一个 ATP。多余的一个质子将运输回线粒体基质，用于 ADP 和～P 的吸收、ATP 的输出。因此，整个过程每产生一个 ATP 需要四个质子。所以，每对电子从复合物Ⅰ传到复合物Ⅳ，会有 12 个电子（每种复合物需四个质子）从线粒体基质泵入膜间空间。当质子通过 ATP 合成酶再次进入线粒体基质时，会产生 3mol ATP（每个 ATP 需四个质子）。所以，氧化磷酸化的理论计量式是：每氧化 1mol DADH 合成 3mol 的 ATP，每氧化 1mol 的琥珀酸合成 2mol 的 ATP

面，接收来自细胞质 NADH 的电子（von Jagow Klingenberg，1970；Watson，1976）。这个脱氢酶可能把它的电子释放给共同的受体 UQ，因为在细胞质 NADH 氧化中只有两个磷酸化位点（Watson，1976）。来自细胞质 NADH 的电子在电子传递链上加工处理的其它机制是借助所谓的穿梭系统，其中最简单的涉及在细胞质中将磷酸二羟丙酮还原为 3-磷酸甘油（$DHAP + NADH \longrightarrow G3P + NAD^+$），然后在线粒体 3-磷酸甘油脱氢酶的作用下将 3-磷酸甘油再氧化成磷酸二羟丙酮。线粒体 3-磷酸甘油脱氢酶的催化位点位于线粒体内膜的外表面，因此为了再氧化 3-磷酸甘油不必通过线粒体内膜。线粒体 3-磷酸甘油脱氢酶是一个含有 FAD 的黄素蛋白，它把电子提供给 UQ 位点上的电子传递链。当电子通过这个穿梭体系进行运输时，NADH 氧化的 P/O 比将类似于琥珀酸氧化的 P/O 比。

2.3.4　回补途径

TCA 循环中的两个中间代谢物，α-酮戊二酸和草酰乙酸是氨基酸和核苷酸生物合成所需的前体代谢物[1]。在 TCA 循环中这两种物质没有净的生成，为满足其它的细胞功能而消耗的这些物质必须通过别的途径来补偿。能完成这些作用的一系列反应总称为回补途径。回补途径（见图 2.10）包括：（1）丙酮酸在丙酮酸羧化酶作用下的羧化；（2）PEP 在 PEP 羧化酶的作用下羧化；（3）苹果酸在苹果酸酶的作用下氧化生成丙酮酸；（4）乙醛酸循环。

---

[1] 在合成亚铁红素的类亚铁红素时，琥珀酰辅酶 A 是作为前体代谢物，但在这里不是这样。这里琥珀酰辅酶 A 作为合成其它基团的辅助因子，生成琥珀酸。琥珀酰辅酶 A 可由琥珀酸消耗 ATP 再生。

最重要的回补途径是由丙酮酸羧化酶或PEP羧化酶催化的二氧化碳固定反应，这导致草酰乙酸生成（见图2.10）。丙酮酸羧化酶受高水平的ATP/ADP比和乙酰辅酶A激活，而被L-天冬氨酸抑制，因此这个酶的调控几乎完全与丙酮酸脱氢酶复合物的情况相反，后者被高水平的ATP/ADP比或NADH/NAD比以及高浓度的乙酰辅酶A所抑制（Zubay，1988）。在酿酒酵母的细胞质和线粒体中都发现丙酮酸羧化酶的活动（Haarasila和Taskinen，1977）。在许多原核生物中，丙酮酸羧化酶是很活泼的，但在真菌中还没被确认。与丙酮酸羧化酶的调控相似，PEP羧化酶受L-天冬氨酸抑制而被乙酰辅酶A激活（Jerren等，1994）。

乙酰辅酶A不能通过线粒体内膜运输到细胞质中，而在细胞质中它是氨基酸和脂类生物合成的关键前体物。对于真核生物，如果细胞在能量需求和生物合成所需碳架之间不平衡，那么就必须在细胞质中合成乙酰辅酶A，这可通过两条不同的途径来实现。(1) 首先利用柠檬酸能在线粒体膜中自由运输，并利用柠檬酸裂解酶将细胞质柠檬酸分解成草酰乙酸和乙酰辅酶A，并同时将ATP水解成ADP［图2.10中反应（13)］。通常，对于乙酰辅酶A的需求要超过对草酰乙酸的需求，由该反应所产生的过剩量草酰乙酸在细胞质苹果酸脱氢酶的催化下生成L-苹果酸。然后L-苹果酸或者再进入线粒体或者在苹果酸酶的作用下氧化脱羧生成丙酮酸［图2.10中反应（15)］。在苹果酸酶催化的L-苹果酸氧化中，形成NADPH，这个反应可能是真核生物细胞质中NADPH合成的主要来源。(2) 第二条途径是经由乙酸生成细胞质乙酰辅酶A。首先丙酮酸被氧化脱羧生成乙酸

$$\underset{(乙酸)}{\text{acetate}} + CO_2 + \text{NADH} + H^+ - \underset{(丙酮酸)}{\text{pyruvate}} - \text{NAD}^+ = 0 \tag{2.11}$$

之后，在乙酰辅酶A合成酶作用下乙酸转化成乙酰辅酶A：

$$\underset{(乙酰辅酶A)}{\text{acetyl-CoA}} + H_2O + \text{AMP} + PP_i - \underset{(乙酸)}{\text{acetate}} - \text{CoA} - \text{ATP} = 0 \tag{2.12}$$

酿酒酵母采用这个途径（Frenkel和Kitchens，1977），但在*A. nidulans*中，乙酰辅酶A合成酶被乙酸诱导而受葡萄糖阻遏（Kelly和Hynes，1982），因此反应（2.12）主要在以乙酸为底物时才是活泼的。

在乙醛酸循环（也称乙醛酸支路）中，异柠檬酸在异柠檬酸裂解酶的作用下裂解成琥珀酸和乙醛酸［图2.10中反应（11)］，乙醛酸可与乙酰辅酶A在苹果酸合成酶的作用下［图2.10中反应（12)］生成L-苹果酸。之后，L-苹果酸经一系列与TCA循环中相同的反应转化成异柠檬酸［图2.10中的反应（9）和反应（2)］。因此，乙醛酸循环的净结果是从两分子乙酰辅酶A合成四碳的琥珀酸。这个途径在乙酸代谢中和脂肪酸代谢中是重要的。这里，乙酰辅酶A是中间代谢物。

在真核生物中，为细胞质提供α-酮戊二酸对生物合成是重要的。这个前体代谢物可由一个特定的通透酶穿越线粒体内膜运输，也可以在细胞质中由细胞质异柠檬酸脱氢酶来合成。在真菌中已经识别出两种不同的异柠檬酸脱氢酶：一种依赖于NAD^+，一种是与$NADP^+$有关的。NAD^+-异柠檬酸脱氢酶总与线粒体结合，在*A. nidulans*中，依赖于$NADP^+$的异柠檬酸脱氢酶受葡萄糖阻遏，主要在以乙酸为生长基质时有活性（Kelly和Hynes，1982）。这可以解释有两种异柠檬酸脱氢酶存在的原因：在以乙酸为生长底物时，可以生成NADPH。这里若经PP途径生成NADPH，则在能量上是很昂贵的。对其它生物体而言，当以葡萄糖为生长基质时也会发现与$NADP^+$相关的异柠檬酸脱氢酶，这里，它可能在NADPH的供应中起重要作用。

2.3.5 脂类、有机酸和氨基酸的分解代谢

长链脂肪酸的分解代谢始于脂肪酸的活化，即与辅酶 A 和 ATP 反应生成脂酰辅酶 A

$$RCO\text{-}CoA + AMP + PP_i - RCOOH - ATP - CoA = 0 \tag{2.13}$$

此反应由酰基辅酶 A 连接酶（或硫激酶）催化，在哺乳动物细胞中发生于胞液中。脂酰辅酶 A 在 β-碳上氧化并先后通过四个反应裂解生成乙酰辅酶 A 和减少了两个碳的脂酰辅酶 A。这个过程连续进行直到脂酰辅酶 A 完全降解成乙酰辅酶 A。该降解反应总化学计量式如下：

$$(n+1)\text{acetyl-CoA} + n\,NADH + n\,FADH_2 + n\,H^+ - CH_3(CH_2)_{2n}CO - CoA$$
$$- n\,NAD^+ - n\,FAD - n\,CoA = 0 \tag{2.14}$$

在哺乳动物中，这个过程发生在线粒体内，脂酰辅酶 A 作为酰基肉碱衍生物运输到线粒体上。$FDAH_2$ 捕获的电子被传递到电子传递链的 UQ 上。在酵母中，脂肪酸的氧化发生在微体中，在过氧化氢释放过程中电子直接从 $FADH_2$ 转移给自由氧，随后过氧化氢由过氧化氢酶降解（Tanaka 和 Fukui，1989）。

乙酰辅酶 A 是乙酸代谢和脂肪酸代谢中常用的中间体，如果以这些物质作为惟一碳源，需要一些特殊的途径来合成通常在糖酵解过程中合成的前体代谢物，如丙酮酸、3-磷酸甘油醛和 6-磷酸己糖。这可通过乙醛酸支路（由乙酰辅酶 A 合成了琥珀酸）和糖异生途径（可认为是与 EMP 途径相反的途径）来实现。当利用乙酸和脂肪酸生长时，糖异生从草酰乙酸（由琥珀酸生成）开始，通过 GTP 进行脱羧及磷酸化后，进而在 PEP 羧化激酶的作用下生成 PEP。接着，PEP 由 EMP 途径的酶转化成 1,6-二磷酸果糖。最后，1,6-二磷酸果糖在二磷酸果糖磷酸酯酶的作用下水解成 6-磷酸果糖，它是单磷酸己糖库的一个组分。当利用乳酸生长时❶，乳酸吸收并转化成丙酮酸后，糖异生的第一步就是在丙酮酸羧化酶的作用下由丙酮酸生成草酰乙酸（见图 2.10）。然后草酰乙酸通过一系列与前面相同的糖异生途径的反应转化成 PEP 以及其它的糖酵解中间物。当然，只有当糖酵解途径上的两个关键反应由磷酸果糖激酶和丙酮酸激酶作用，并在正反应方向（即糖酵解方向）上不活跃时，糖异生途径才能进行。这可通过控制这些酶（它总是存在的）的活性来实现。通过使 2,6-二磷酸果糖（磷酸果糖激酶的激活剂）缺乏或控制 1,6-二磷酸果糖（丙酮酸激酶的激活剂）在较低的水平就可以达到上述目的（Gancedo 和 Serrano，1989）。当利用葡萄糖生长时，糖异生途径的两个特异酶受到葡萄糖阻遏。

许多生物体能合成和分泌胞外蛋白酶，能把蛋白质水解成低分子量的肽和氨基酸。肽在吸收之前不必完全水解为氨基酸，因为许多微生物能够运输小的寡肽，即直到五肽。只要是在细胞内，这些寡肽就被胞内的蛋白酶或肽酶水解。胞内和胞外的蛋白酶都受氨的阻遏，而且蛋白酶的合成受过量的碳、硫和磷酸阻遏。蛋白质水解后，大多数生成的氨基酸分解代谢始于转氨反应，即通过谷氨酸转氨酶将 α-氨基氮转移至 α-酮戊二酸：

$$\underset{(谷氨酸)}{\text{glutamate}} + \underset{(\alpha\text{-酮酸})}{\alpha\text{-keto acid}} - \underset{(\alpha\text{-酮戊二酸})}{\alpha\text{-ketoglutarate}} - \underset{(\alpha\text{-氨基酸})}{\text{L-amino acid}} = 0 \tag{2.15}$$

接着，谷氨酸由与 NAD 相关的谷氨酸脱氢酶进行氧化脱氨，重新生成 α-酮戊二酸：

$$\alpha\text{-ketoglutarate} + NH_3 + NADH + H^+ - \text{glutamate} - NAD^+ - H_2O = 0 \tag{2.16}$$

---

❶ 真菌中的乳酸代谢始于在乳酸脱氢酶的作用下丙酮酸的生成。真菌的乳酸脱氢酶是黄素蛋白不能催化该反应的逆反应，此时，这种真菌不能产生乳酸。酵母中的乳酸脱氢酶位于线粒体的膜间隙，含有辅酶 FDA，此酶可把电子直接传给细胞色素 c，并受乳糖诱发葡萄糖抑制。

与 NAD 相关的谷氨酸脱氢酶主要适合分解代谢功能，当在不含有氨基酸的基本培养基中生长时，其活性通常很低。脱氨之后的碳骨架断开生成丙酮酸、乙酰辅酶 A 或 TCA 循环的一个中间代谢物（见表 2.4）。对某些氨基酸而言，碳骨架断开过程包含很多步骤，如色氨酸生成乙酰辅酶 A 包括 12 步。其它的氨基酸脱氨后可直接转化成其最终代谢物。

表 2.4　氨基酸的分解产物

产品种类	氨　基　酸
丙酮酸	丙氨酸(1),丝氨酸(1),巯基丙氨酸(3),氨基乙酸(1)
乙酰辅酶 A	苏氨酸(1),赖氨酸(10),亮氨酸(8),酪氨酸(7),苯基丙氨酸(8),色氨酸(12)
α-酮戊二酸	谷氨酸(1),谷氨酸盐(2),脯氨酸(3),精氨酸(4),组氨酸(5)
琥珀酰辅酶 A	蛋氨酸(9),异亮氨酸(9),缬氨酸(8)
草酰乙酸	天冬氨酸(1),天冬酰胺(2)

注：表中带括号的数字表示高级真核细胞的分支途径。根据式（2.16），对于大多数氨基酸来说，括号中的数字常常是一个分支途径中去氨基作用的结果。

2.4　生物合成反应

细胞合成所需的结构单元、辅酶以及辅基的数量大约为 75～100 个，这些都是由生物合成途径中合成的 12 种前体代谢物合成的（Ingraham 等，1983）。本节概述了生物合成途径，重点集中在这些生物合成途径在细胞生长中的所起的作用以及操作这些途径所需的策略。因此没有详述该途径中具体的单个反应步骤，而只是考虑了主要的生物合成途径，如氨基酸、核苷酸、糖类、氨基糖和脂类的生物合成途径。更多的细节可参见一些生物化学书籍和有关综述文献［如 Umbarger（1978）关于真菌中氨基酸的生物合成；Jone 和 Fink（1982）关于真菌中氨基酸和核苷酸的生物合成以及 Neidhardt 等（1987）关于细菌中结构单元的生物合成的广泛处理］。

2.4.1　氨基酸的生物合成

众所周知，氨基酸是合成蛋白质的结构单元，而且这确实是细胞中常见的 20 种氨基酸的主要功能。然而，氨基酸也可作为其它结构单元和重要次级代谢产物如青霉素生物合成的前体物。氨基酸生物合成的第一步是氮的同化吸收，由此氮以氨的形式被固定和结合在有机分子中。这主要通过利用 α-酮戊二酸生物合成 L-谷氨酸来实现：

$$\underset{\text{(L-谷氨酸)}}{\text{L-glutamate}} + NADP^+ + H_2O - \alpha\text{-ketoglutarate} - NH_3 - NADPH - H^+ = 0 \qquad (2.17)$$

这个反应由连接 NADP 的谷氨酸脱氢酶（GDH）来催化完成。这个酶是细胞代谢中的关键酶——而且不同于 NAD-GDH，后者催化相反的反应（2.16），这两种酶代表不同类型的调节机制。NADP-GDH 受 L-谷氨酸阻遏，而且当利用葡萄糖生长时活性很高，而 NAD-GDH 受葡萄糖阻遏。

L-谷氨酸生物合成的另一路线是经过所谓的 GS-GOGAT 途径，由两步组成：第一步，L-谷氨酰胺作为氨基的供体，把氨基给 α-酮戊二酸，结果生成两个 L-谷氨酸：

$$2\text{L-glutamate} + NADP^+ - \alpha\text{-ketoglutarate} - \underset{\text{(L-谷氨酰胺)}}{\text{L-glutamine}} - NADPH - H^+ = 0 \qquad (2.18)$$

催化这个反应的是谷氨酸合成酶（缩写为 GOGAT，来自先前的俗名谷氨酰胺酰胺-2-酮戊二酸氨基转移酶）。第二步是谷氨酰胺的再生：

$$\text{L-glutamine} + ADP + \sim P - \text{L-glutamate} - NH_3 - ATP = 0 \qquad (2.19)$$

此反应由谷氨酰胺合成酶（GS）催化完成。上述两步反应（2.18）和反应（2.19）的总和是从 α-酮戊二酸到 L-谷氨酸的净合成，这与反应（2.17）相似，但重要差别在于这里需要能量，即每生成一个谷氨酰胺需要水解一个 ATP。GS-GOGAT 途径对于氨的同化吸收是一个高亲和力的系统，其主要在低氨浓度时才活泼，因为谷氨酸合成酶受氨的阻遏。L-谷氨酰胺在好几种含氮化合物的生物合成中都可作为氨（氮）的供体，这在整个细胞代谢中是一个重要的分支点。谷氨酰胺合成酶受严格的调控：它受 L-谷氨酰胺的阻遏，同时它也受（起因可以追溯到 L-谷氨酰胺）代谢途径的许多末端产物（如 AMP，GTP，L-甘氨酸和 L-组氨酸）的抑制。许多生物体也可以利用硝酸盐或亚硝酸盐作为惟一的氮源，这些化合物在同化吸收前都要转化成氨，因此氨是整个氮代谢中的一个中心化合物。将亚硝酸盐还原为氨要

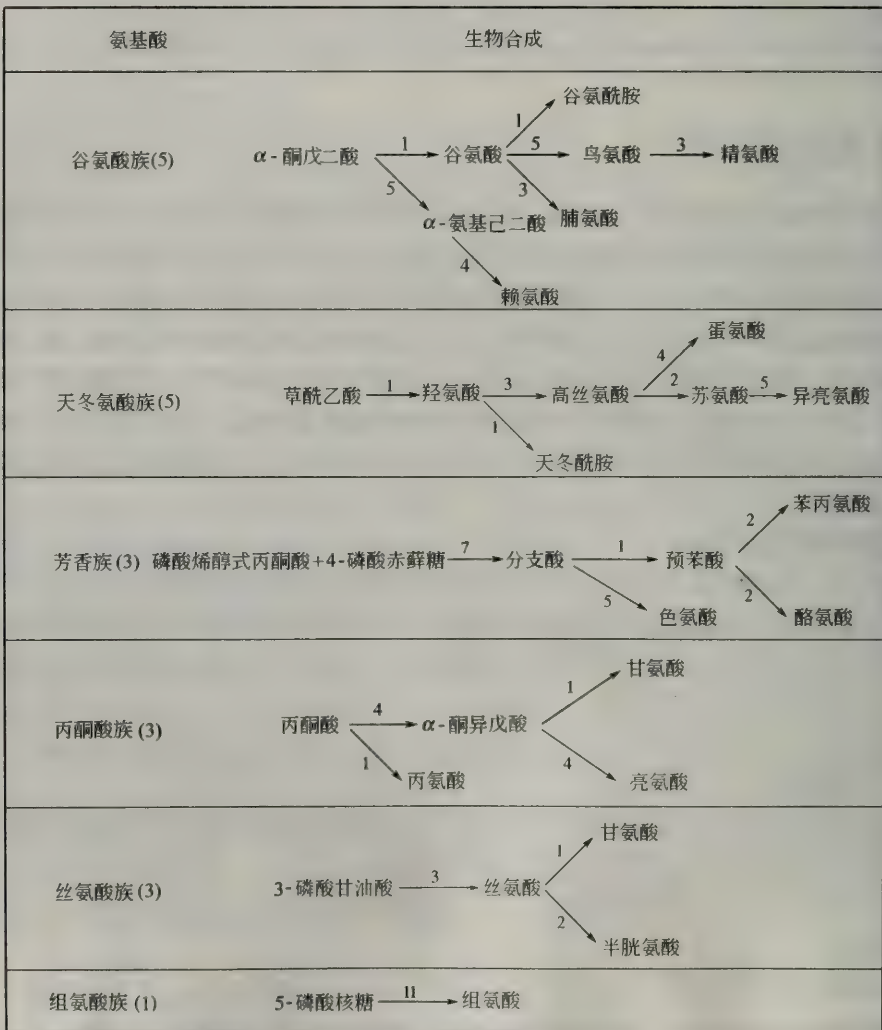


图 2.12　真核体内氨基酸的生物合成

根据合成起点的特定前提代谢物和氨基酸，这些氨基酸可以分为五组。L-组氨酸因为具有复杂的生物合成途径，与其它的氨基酸均不同组。图中数字表示代谢途径中所需的反应步骤。除了 L-赖氨酸，这些数字对于细菌的代谢也是适用的。在细菌中，L-赖氨酸通过二氨基庚二酸（细菌细胞壁的重要构成单元）由天冬氨酸经过 9 步合成

经过硝酸盐、低硝酸（hyponitrate，N_2O_2）、一氧化二氮（N_2O）和羟氨（NH_2OH）。在这些还原反应中氢的供体为 NADPH。硝酸盐和亚硝酸盐的吸收可能与胞液中这些物质的还原相耦合。

已经阐明了许多真核生物和原核生物中所有 20 种常见氨基酸的生物合成途径，图 2.12 概括了这些途径。这些生物合成路线有一些差别，其中赖氨酸生物合成最重要。在细菌和高等植物中，赖氨酸由丙酮酸和天门冬氨酸-β-半醛中间再经由二氨基庚二酸（细菌细胞壁合成的重要结构单元）合成。而在真菌中，赖氨酸由 α-酮戊二酸经由 α-氨基己二酸合成。

表 2.5 总结了细菌和真菌中氨基酸生物合成的代谢消耗。L-蛋氨酸和 L-组氨酸的生物合成需要转移一个一碳基团，分别由 N^5-甲基四氢叶酸和 10-甲酰四氢叶酸提供（都转化成四氢叶酸）。这两种不同形式的四氢叶酸可以相互转化，为了分析代谢消耗，方便的方法是使用一个共同的基础。在表 2.5 中，5,10-次甲基四氢叶酸（5,10-MTHF）转化成四氢叶酸（THF）用做共同的基础，因为这个转化与从 L-丝氨酸合成 L-甘氨酸相联系。然而在 L-甘氨酸生物合成中生成的 5,10-MTHF 的数量一般不能满足对一碳转移基团的需求。另外所需要的一碳转移基团最可能的来源是甘氨酸中的 α-碳，甘氨酸在甘氨酸氧化酶作用下按式（2.20）降解：

$$CO_2 + NH_3 + 5,10\text{-MTHF} + NADH + H^+ - \underset{\text{(L-甘氨酸)}}{\text{L-glycine}} - THF - NAD^+ = 0 \qquad (2.20)$$

表 2.5 细菌和真菌中 20 种氨基酸生物合成的代谢消耗

氨基酸	前体代谢物①	ATP②	NADH	NADPH	1-C③	NH_3	S④
L-丙胺酸	1pyr	0	0	−1	0	−1	0
L-精氨酸	1αkg	−7	1	−4	0	−4	0
L-天冬酰胺酸	1oaa	−3	0	−1	0	−2	0
L-天冬氨酸	1oaa	0	0	−1	0	−1	0
L-巯基丙氨酸⑤	1pga	−4	1	−5	0	−1	−1
L-谷氨酸	1αkg	0	0	−1	0	−1	0
L-谷氨酸盐	1αkg	−1	0	−1	0	−2	0
L-氨基乙酸	1pga	0	1	−1	1	−1	0
L-组氨酸	1penP	−6	3	−1	−1	−3	0
L-异亮氨酸	1oaa,1pyr	−2	0	−5	0	−1	0
L-亮氨酸	2pyr,1acCoA	0	1	−2	0	−1	0
L-赖氨酸(真菌)	1αkg，1acCoA	−2	2	−4	0	−2	0
L-赖氨酸	1pyr,1oaa	−3	0	−4	0	−2	0
L-蛋氨酸	1oaa	−7	0	−8	−1	−1	−1
L-苯基丙氨酸	2pep,1eryP	−1	0	−2	0	−1	0
L-脯氨酸	1αkg	−1	0	−3	0	−1	0
L-丝氨酸	1pga	0	1	−1	0	−1	0
L-苏氨酸	1oaa	−2	0	−3	0	−1	0
色氨酸	2pep,1eryP,1penP	−5	2	−3	0	−2	0
酪氨酸	2pep,1eryP	−1	1	−2	0	−1	0
缬氨酸	2pyr	0	0	−2	0	−1	0

① acCoA—乙酰辅酶 A；eryP—4-磷酸赤藓糖；fruP—6-磷酸果糖；gluP—6-磷酸葡萄糖；αkg—α-酮戊二酸；glyP—3-磷酸甘油醛；oaa—草酰乙酸；penP—5-磷酸核糖；pep—磷酸烯醇丙酮酸；pga—3-磷酸甘油；pyr—丙酮酸。

② 对于上述反应一个 ATP 水解为一个 AMP 过程需消耗两个 ATP。

③ 5,10-二亚甲基四水合叶酸是作为碳供体转化为四水合叶酸。其它形式的四水合叶酸作生物合成 L-蛋氨酸和 L-组氨酸的基质。

④ 硫酸盐是 S 的来源，并在同化前还原为 H_2S

⑤ 假设 L-丝氨酸直接氢硫化。

2.4.2 核酸、脂肪酸和其它结构单元的生物合成

以核糖核苷酸和脱氧核糖核苷酸形式存在的核苷酸分别是 RNA 和 DNA 的结构单元，然而它们在细胞中还有许多其它功能。它们是一些辅助因子（如：NADH，NADPH，FAD，CoA）和其它一些核苷酸（如在整个细胞代谢中具有特殊功能的 ATP）的主要组分。核苷酸由三部分组成：(1) 一个杂环的含氮碱基，嘌呤或嘧啶；(2) 一个糖（RNA 中的核糖和 DNA 中的 2-脱氧核糖）；(3) 一个磷酸基团。DNA 的碱基是嘌呤［腺嘌呤（A）、鸟嘌呤（G）］及嘧啶［胸腺嘧啶（T）和胞嘧啶（C）］，在 RNA 中存在其中的三种碱基，但第四种胸腺嘧啶（T）被尿嘧啶（U）所代替。

脱氧核糖核苷酸（dAMP，dGMP，dUMP 和 dCMP）是由相应的核糖核酸（AMP，GMP，UMP 和 CMP）通过由氢取代 2′-OH 基团而来的（氢是由 NADPH 提供），dTMP 是 dUMP 通过甲基化而得到的。核苷酸是由 5-磷酸核糖和 3-磷酸甘油酸（用于嘌呤生物合成）或草酰乙酸（用于嘧啶生物合成）合成的。表 2.6 列出了核苷酸生物合成的代谢消耗。

表 2.6 生物合成核苷酸的代谢消耗

核苷酸	代谢前体物①	ATP	NADH	NADPH	1-C	NH_3
AMP	1pga,1penP	−9	3	−1	−1	−5
GMP	1pga,1penP	−11	3	0	−1	−5
UMP	1oaa,1penP	−5	0	−1	0	−2
CMP	1oaa,1penP	−7	0	−1	0	−3
dAMP	1pga,1penP	−9	3	−2	−1	−5
dGMP	1pga,1penP	−11	3	−2	−1	−5
dTMP②	1oaa,1penP	−5	0	−3	−1	−2
dCMP	1oaa,1penP	−7	0	−2	0	−3

① 相关术语查阅表 2.5。

② dTMP 生物合成的消耗等同于从 dUMP 的合成。dTMP 也可由 dCMP 合成，但需要更多的消耗，也就是 9 个 ATP。对于*E.coli*，Inhraham et al.（1983）指出它的 dTMP 75%来自于 dCMP，25%来自于 dUMP。

脂类是一种异源化合物，包括：(1) 酰基甘油；(2) 磷脂；(3) 固醇。这些脂类组分的主要结构单元为脂肪酸，它存在于酰基甘油、磷脂和固醇酯（固醇的主要库）中。主要的脂肪酸有：棕榈酸（C16：0），棕榈油酸（C16：1），硬脂酸（C18：0），油酸（C18：1），亚油酸（C18：2）和亚麻酸（C18：3）。在真菌中，棕榈酸、油酸和亚油酸要占 75%以上（Ratledge 和 Evans，1989），而细菌中最常见的脂肪酸为棕榈酸、棕榈油酸和油酸（Ingraham 等，1983）。饱和脂肪酸的生物合成是通过在活化了的乙酰辅酶 A 上连续添加两个碳单位而实现的。这些碳单位是由丙二酸单酰辅酶 A 提供的，而丙二酸单酰辅酶 A 是由乙酰辅酶 A 羧化而成的（Walker 和 Woodbine，1976）。在酵母（也可能在其它真菌）中，末端产物为脂肪酰辅酶 A 酯，而不是脂肪酸（Ratledge 和 Evans，1989）。生物合成 n 个链的脂酰辅酶 A 的总化学计量式为

$$CH_3(CH_2)_{n-2}CO\text{-}CoA+\frac{n-2}{2}CoA+\frac{n}{2}H_2O+\frac{n-2}{2}ADP+\frac{n-2}{2}P$$
$$+\frac{n-2}{2}NADP^+-\frac{n}{2}acetyl\text{-}CoA-\frac{n-2}{2}ATP-(n-2)NADPH-(n-2)H^+=0 \qquad (2.21)$$

细菌中，单不饱和脂肪酸的合成是通过厌氧途径进行的，从这个名字中就可知道，这个途径在缺氧条件下才起作用。前已提及，只有当 4 个丙二酸单酰辅酶 A 已经加到增长着的碳链上后，这个途径才开始进行。生成的化合物 β-羟癸酰基-ACP 成为生物合成饱和脂肪酸和单

不饱和脂肪酸之间的一个分支点。在 β-羟癸酰基硫酯脱水酶的作用下，插入了一个 β，γ-顺式双键，然后 β，γ-不饱和酰基延长生成棕榈油酸。在真核生物中，第九个碳原子上的双键是在 C_{16}或 C_{18}饱和脂肪酰辅酶 A 已经合成后才引入的（Walker 和 Woodbine，1976；Ratledge 和 Evans，1989）。这个转化是由结合在内脂网上的特定酶系催化完成的，反应需要 NADH 和分子氧，反应式如下

$$\underset{\text{(油酰辅酶 A)}}{\text{oleoyl-CoA}} + 2H_2O + NAD^+ - \underset{\text{(硬脂酰辅酶 A)}}{\text{stearol-CoA}} - O_2 - NADH - H^+ = 0 \qquad (2.22)$$

细菌中不具有多不饱和脂肪酸，而真核生物能产生大量的多不饱和脂肪酸，多不饱和脂肪酸的合成可通过与式（2.22）相似的反应来完成。另外，单不饱和脂肪酸在结合一个磷脂后可以进一步减小饱和度（Walker 和 Woodbine，1976；Ratledge 和 Evans，1989）。

脂类组分的其它重要结构单元有：(1) 3-磷酸甘油，它是磷脂和三酰甘油酯的重要组成部分；(2) 磷脂的醇部分；(3) 固醇。3-磷酸甘油是从 EMP 途径中的磷酸二羟丙酮直接转化来的。在真菌中最常见的磷脂醇有：胆碱，胆胺和肌醇（Rose，1976）。因此在酿酒酵母中，磷脂酰胆碱（PC），胆胺磷脂（PE）和磷脂酰肌醇（PI）占整个脂类的 90% 以上（Ratledge 和 Evans，1989）。胆胺和胆碱不能以游离的形式合成，相应的磷脂是从其它的磷脂生成的。因此 PE 是由磷脂酰丝氨酸（一种含量很低的以 L-丝氨酸为醇部分的磷脂）直接脱羧生成的，PC 是 PE 连续甲基化而生成的。PI 是由游离的肌醇相互结合而生成的，而肌醇是 6-磷酸葡萄糖经过一个两步途径生成的（Umezawa 和 Kishi，1989）。首先磷酸肌醇合成酶用 NAD^+ 为电子受体将 6-磷酸葡萄糖转化成 1-磷酸肌醇，然后肌醇-1-磷酸酯酶将 1-磷酸肌醇转化成肌醇。在酿酒酵母中麦角固醇占固醇的 90% 以上。到麦角固醇的途径要途经鲨烯，它是固醇生物合成中常见的一个中间物。目前酿酒酵母中生成鲨烯的步骤已研究得很清楚，但是由鲨烯进一步转化成麦角固醇（或其它固醇）的详细步骤还不很清楚。细菌中最重要的磷脂种类有：胆胺磷脂（75%～85%），磷脂酰甘油（10%～20%）和双磷脂酰甘油（5%～15%）。这三种磷脂在直到 CDP-二酰基甘油以前的途径是相同的，然后途径开始分支。胆胺磷脂是经磷脂酰丝氨酸脱羧合成的，而磷脂酰丝氨酸是由 L-丝氨酸取代 CDP 而生成的。用 3-磷酸甘油取代 CDP-二酰基甘油中的 CDP，接着将磷酸与甘油部分中的连接处断开即生成了磷脂酰甘油。最后，两个磷脂酰甘油缩合生成双磷脂酰酶甘油并同时释放出一个甘油。

合成糖原的结构单元为 UDP-葡萄糖，同时它也是合成大肠杆菌和其它革兰阴性菌中脂多糖层以及真菌细胞壁的结构单元。UDP-葡萄糖由 1-磷酸葡萄糖在焦磷酸化酶作用下生成。当己糖结合进一个聚合物时释放出 UDP，因此在一个延伸的糖链中加入一个己糖单磷酸的总消耗是一个 UTP（相当于一个 ATP）。构成细菌细胞壁的肽聚糖的生物合成需要 5 个单体：UDP-N-乙酰葡萄糖胺（UDP-NAG），UDP-N-乙酰胞壁酸（UDP-NAM），丙氨酸（L-型和 D-型），二氨基庚二酸和谷氨酸。UDP-N-乙酰葡萄糖胺（它也是真菌中合成几丁质的结构单元）是由 6-磷酸果糖和乙酰辅酶 A 合成的，L-谷氨酰胺为氨基供体，总化学计量式如下

$$\text{UDP-NAG} + \underset{\text{(L-谷氨酸盐)}}{\text{L-glutamate}} + \text{CoA} + \sim\text{PP} - \underset{\text{(6-磷酸果糖)}}{\text{fructose-6-phosphate}} - \text{acetyl-CoA}$$
$$- \text{L-glutamine} - \text{UTP} = 0 \qquad (2.23)$$

当 UDP-Glc-NAc 结合成肽聚糖或几丁质时，释放出 UDP，因此合成一个几丁质单体的总能耗为 UTP。糖类结构单元和脂类的生物合成的代谢消耗列于表 2.7 中。

表 2.7 生物合成脂类和糖类结构单元的代谢消耗

结构单元	代谢前体物①	ATP	NADH	NADPH	1-C	NH_3
3-磷酸甘油	1 glyP	0	-1	0	0	0
棕榈酰辅酶 A	8 acCoA	-7	0	-14	0	0
棕榈油酰辅酶 A②	8 acCoA	-7	0	-14	0	0
硬脂酰辅酶 A	9 acCoA	-8	1	-16	0	0
油酰辅酶 A	9 acCoA	-8	2	-16	0	0
亚油酰辅酶 A	9 acCoA	-8	3	-16	0	0
亚麻酰辅酶 A	9 acCoA	-8	1	-16	0	0
乙醇胺③	1 pga	0	1	-1	0	-1
维生素 B	1 pga	0	1	-1	-3	-1
肌糖	1 gluP	0	1	0	0	0
麦角固醇	18 acCoA	-18	0	-13	0	0
UDP-葡萄糖	1 gluP	-1	0	0	0	0
UDP-半乳糖	1 gluP	-1	0	0	0	0
UDP-NAG	1 fruP, 1 acCoA	-2	0	0	0	-1
UDP-NAM	1 fruP, 1 pep, 1 acCoA	-2	0	-1	0	-1
二氨基庚二酸盐	1 oaa, 1 pyr	-2	0	-3	0	-2

① 相关术语查阅表 2.5。

② 棕榈油酰辅酶 A 的生物合成消耗是通过厌氧途径。

③ 由于从鲨烯到麦角固醇的途径尚未完全了解，因此我们认为麦角固醇在生物合成的代谢消耗等同于鲨烯的值。

2.5 聚合反应

细胞生物质中的大分子可分成以下几类：(1) RNA；(2) DNA；(3) 蛋白质；(4) 糖类；(5) 氨基糖和 (6) 脂类。大分子组成随生物种类的不同而不同，对于一个已给的生物，其大分子组成随比生长速率和环境条件而改变。图 2.13 列出了细菌和真菌中最重要的大分子库与比生长速率之间的函数关系。细菌中，蛋白质和 RNA 占生物质的 80%以上，稳定的 RNA 含量随比生长速率而增加，而蛋白质含量随比生长速率而降低，而其它的库中组分如 DNA，脂类，脂多糖，氨基糖（肽聚糖）以及糖类（主要为糖原）则基本恒定。在真菌中则存在很大不同，总糖库（糖和氨基糖的总合）占生物质的很大比例，约 20%～30%，而且这个比例随比生长速率而降低。糖类库主要存在于细胞壁中，这说明随比生长速率的不断增加而生物质比例不断降低。如同细菌一样，真菌中 RNA 含量随比生长速率而增加，但与细菌相反，真菌中蛋白质组分也随比生长速率而增加。在细菌和真菌中稳定的 RNA 的这种线性增加，在其它许多不同种类生物中也存在，据报道，酿酒酵母中蛋白质含量随比生长速率的增加而有个慢的增加。

细胞 RNA 总库由信使 RNA (mRNA)，核糖体 RNA (rRNA) 和转运 RNA (tRNA) 组成。在大肠杆菌中，当比生长速率为 1.0 h^{-1}时，RNA 组分为 5% mRNA，18% tRNA，77% rRNA (Ingraham 等，1983)。在低比生长速率下，当 rRNA 含量消耗时，tRNA 的相对含量增加。在 *Neurospora crassa* 中也可看到类似的情况，每个核糖体中 tRNA 分子的数目随比生长速率的增加而降低 (Alberghina 等，1979)。然而，即使在低的比生长速率条件下，rRNA 也占稳定的 RNA（即 rRNA 与 tRNA 之和）75%以上。因此，稳定的 RNA 库是细胞内核糖体水平的一个很好的度量标准。黑曲霉中核糖体由 53%的 rRNA 和 47%的蛋白质组成 (Berry 和 Berry，1976)，大肠杆菌中核糖体含有 60%的 rRNA 和 40%的蛋白质。核糖体在蛋白质合成中起了重要的作用，核糖体和一些酶一起构成了所谓的蛋白质合成系统 (protein synthesizing system，PSS) (Ingraham 等，1983)。

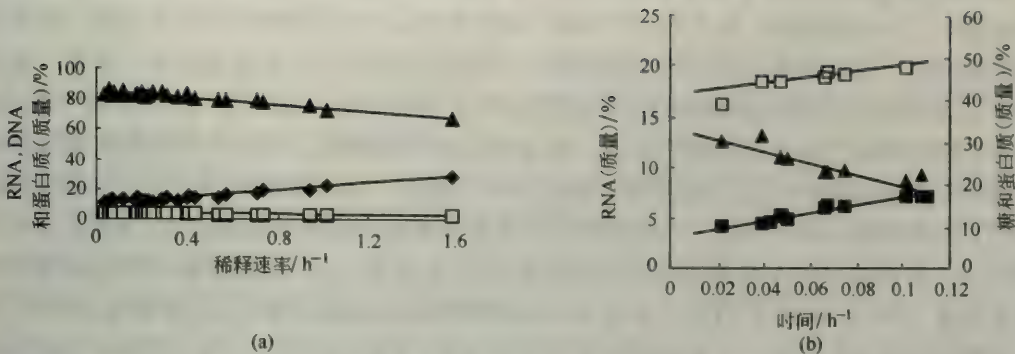


图 2.13　细菌和真菌中最重要的大分子库随比生长速率的变化

(a) 在 *E. coli* 中的蛋白质库（▲），RNA 库（◆）以及 DNA 库（□），数据来自于 Ingraham et al (1983)；
(b) 在 *P. chrysogenum* 中的蛋白质库（□），RNA 库（■）以及糖类库（▲），数据来自于 Nielesen (1997)

由于细胞的蛋白质合成耗能甚多（见表 2.8），因此细胞中存在 PSS 的严密控制。所以，细胞根据需要调节其核糖体水平。这也解释了为什么稳定的 RNA 库与比生长速率呈正相关（见图 2.13）。当环境条件发生动态变化以及改变实验条件使比生长速率下降时，在稳定的 RNA 含量与比生长速率之间可以观察到类似的关系：直到核糖体的含量已经适应于新的生长条件时，rRNA 的合成才停止（Sturani 等，1973）。在低的比生长速率下，*N.crassa* 的核糖体水平接近定值，但核糖体的效率随比生长速率的升高而下降（Alberghina 等，1979）。因此，PSS 的净效率随比生长速率趋于零而继续下降。在 *A.nidulan*（Bushell 和 Bull，1976）和大肠杆菌（Ingraham 等，1983）中也观察了类似的结果。因此，在低比生长速率时，细胞中具有一些未使用的和未被有效使用的代谢机能。一旦环境条件发生改变，该机能可被迅速激活。

表 2.8　不同种类生物中细胞蛋白质的氨基酸组成（以摩尔分数表示）

氨　基　酸	*E. coli*①	*P. chrysogenum*②	*S. cerecisiae*③
L-丙氨酸	9.6%	10%	4.7%
L-精氨酸	5.5%	4.8%	5.6%
L-天冬酰氨酸/L-天冬氨酸盐	9.0%	9.6%	12.7%
L-胱氨酸	1.7%	1.4%	0.9%
L-谷氨酸盐/L-谷氨酸	9.8%	14.9%	13.4%
L-氨基乙酸	11.5%	9.2%	5.6%
L-组氨酸	1.8%	2.4%	9.1%
L-异亮氨酸	5.4%	4.3%	5.2%
L-亮氨酸	8.4%	7.5%	7.9%
L-赖氨酸	6.4%	5.6%	3.1%
L-蛋氨酸	2.9%	1.7%	4.7%
L-苯基丙氨酸	3.5%	3.4%	4.0%
L-脯氨酸	4.1%	4.7%	4.3%
L-丝氨酸	4.0%	6.1%	5.2%
L-苏氨酸	4.7%	5.3%	1.4%
L-色氨酸	1.1%		4.0%
L-酪氨酸	2.6%	2.6%	6.5%
L-缬氨酸	7.9%	6.4%	1.7%

① 有关 *E. coli* 的数据来自于 Ingraham et al (1983)。

② 有关 *P. chrysogenum* 的数据来自于 Henriksen et al (1996)。

③ 有关 *S. cerevisiae* 的数据来自于 Cook (1958)。

mRNA 翻译成蛋白质主要发生在由 60S 和 40S 两个亚基组成的细胞质 80S 核糖体上。真核生物中，一些蛋白质，如 F_1F_0-ATP 酶，细胞色素 b 和 TCA 循环中的某些酶，是在线粒体中合成的，而线粒体包含 DNA 和核糖体。翻译过程包括三个独立的阶段：起始，延长和终止。起始阶段是由相当多数量的特定蛋白因子催化的（至少 10 个），其结果是一个 80S 起始复合物的形成。起始复合物形成后，通过在延伸着的肽链上连续添加氨基酸使肽链延长。延长阶段包括四步：（1）氨基酸与同族 tRNA 连接；（2）氨基酰-tRNA 与核糖体的结合；（3）形成肽键；（4）移位，导致肽基-tRNA 在核糖体中的移动及伴随着 mRNA 移动一个密码子。氨基酰-tRNA 的激活与形成需要将 ATP 水解成 AMP，氨基酰-tRNA 结合到核糖体上需要 GTP 水解成为 GDP，肽基-tRNA 在核糖体中的移位需 GTP 水解成 GDP。因此，在延伸的肽链上添加一个氨基酸共需要 4 个 ATP 等价物。另外，在 mRNA 合成与校对等过程中还需要一些自由能，总计是每结合一个氨基酸约需 0.3 ATP（Ingraham 等，1983）。对于微生物细胞的氨基酸组分（见表 2.8），摩尔质量约为 110g/mol 蛋白质结合氨基酸，1g 蛋白质的聚合总化学计量式为（所有计量系数以 mmol 表示）

$$\underset{\text{(1g 蛋白质)}}{\text{“1g of protein”}} + 39.1\ \text{ADP} + 39.1 \sim \text{P} - \underset{\text{(氨基酸)}}{9.1\ \text{amino acid}} - 39.1\ \text{ATP} = 0 \qquad (2.24)$$

核 DNA 转录成 RNA 需要三种 RNA 聚合酶来完成：RNA 聚合酶 A，用于合成 rRNA；RNA 聚合酶 B，用于合成 mRNA；RNA 聚合酶 C，负责合成 tRNA。单磷酸核苷酸结合形成 RNA 之前，必须转化成三磷酸核苷酸，这对每个核苷酸来说需要两个 ATP。而且，在 RNA 合成过程中，最初转录产物的一个片段，在转录后需被移走并水解成为单磷酸核苷酸，重新激活这些核苷酸也需要两个 ATP。Ingraham 等（1983）认为大约有 20% 的初始转录物被丢弃，因此结合一个核糖核苷酸（作为单磷酸）的能量消耗为 2.4 个 ATP。酿酒酵母中以 1mol 为基准的全部 RNA 的核苷酸组成为：25.6% AMP，26.2% UMP，28.6% GMP，19.6% CMP（Mounolou，1975），因此，可得 RNA 的摩尔质量为 323g/mol 的 RNA 结合核苷酸。因此，合成 1g RNA 的总化学计量式为（所有计量系数以 mmol 表示）

$$\text{“1g of RNA”} + 7.44\ \text{ADP} + 7.44 \sim \text{P} - 0.79\ \text{AMP} - 0.81\ \text{UMP} - 0.89\text{GM}$$
$$- 0.61\ \text{CMP} - 7.44\ \text{ATP} = 0 \qquad (2.25)$$

DNA 复制是一个复杂的过程。在 DNA 聚合酶能够复制 DNA 双链之前，双螺旋结构必须被打开，这需要一组特殊的酶来完成，而且这个过程需要输入吉布斯自由能来打开互补碱基之间的氢键。螺旋中缠绕的双链的分离在单链中形成环，称为超螺旋卷曲。为避免在已解开的 DNA 链上产生超螺旋卷曲，DNA 旋转酶定期地打开其中一个链上的磷酸酯键，以允许相对的链能自由旋转。旋转之后，同样的酶使之重新形成键。解开双螺旋的总能耗为每对碱基两个 ATP，即 DNA 每结合一个核苷酸需要 1 个 ATP（Ingraham 等，1983）。双链一旦分离，DNA 聚合酶就开始复制，即核苷酸（活化成三磷酸的形式）的组装。DNA 的复制是非常精确的，即复制 10^{10} 个核苷酸可能出现一个错误。这种准确性部分是通过 DNA 聚合酶中的一种固有的外切核酸酶活性来实现的。这种 DNA 聚合酶通过向后移动而除去其自己的错配，而且只有它后面是一个正确匹配的碱基对时，它才能沿前进方向催化复制地进行。校正所需的能耗估计是每个核苷酸 0.4 个 ATP（Ingraham 等，1983）。因此，结合一个脱氧核糖核苷酸（作为单磷酸）的总能耗为 3.4 个 ATP。不同种类生物间的细胞 DNA 的组成只有少许差别，组成近似是 24.5% dAMP，24.5% dTMP，25.5% dGMP，25.5% dCMP。由此得出 DNA 的摩尔质量为 310g/mol DNA 结合核苷酸，而合成 1g 结合 DNA 核苷酸的总

化学计量式为（所有计量系数以 mmol 表示）

$$\text{“1g of DNA”} + 11.0\ \text{ADP} + 11.0 \sim \text{P} - 0.79\ \text{dAMP} - 0.79\ \text{dTMP} - 0.82\ \text{dGMP} - 0.82\ \text{dCMP} - 11.0\ \text{ATP} = 0 \tag{2.26}$$

磷脂的生物合成首先是由脂酰辅酶 A 与 3-磷酸甘油的 1 碳和 2 碳结合生成磷脂酸，按着由 CTP 活化而生成 CDP-二脂酰甘油。最后，醇结合到磷酸基团上，释放出 CMP。因此，从结构单元合成磷脂的能耗是从 CTP 转化为 CMP，这对应于两个 ATP。为了计算合成磷脂生物合成总代谢消耗，需要知道不同种类磷脂的相对含量和脂肪酸的相对含量。酿酒酵母中磷脂的组分有：约 50% PC，20% PI 和 30% PE，大肠杆菌中约 95% 的磷脂是 PE 和磷脂酰甘油，两种成分约等量存在。总的脂肪酸组分依生物的不同而不同，也取决于环境条件［见 Ratledge 和 Evans（1989）的关于酵母脂肪酸组分的综述］。酿酒酵母中的典型组分为：15.6% C16：0，31.4% C16：1，5.1% C18：0，32% C18：1 和 3.4% C18：2。在产黄青霉中总脂肪酸组分为：8% C16：0，7% C18：0，24% C18：1，59% C18：2 和 2% C18：3（Meisgeier 等，1990）。大肠杆菌中的脂肪酸组分为：约 43% C16：0，33% C16：1 和 24% C18：1（Ingraham 等，1983）。

固醇酯是通过直接把固醇（代表性的是麦角固醇）加到脂酰辅酶 A 上而得的，三脂酰甘油是用脂酰辅酶 A 取代磷脂酸上的磷酸基团而得。磷脂酸是随着把脂酰辅酶 A 加到 3-磷酸甘油的磷酸化的碳上而得。

2.6 生长能学

生长能学描述了吉布斯自由能（通常是 ATP 的形式）的产生与消耗的关系，因此涉及到运输、供能反应、生物合成反应以及大分子合成反应。生长能学起源于经典的得率研究，其中质量得率系数 Y_{sx}（见 3.4 节），是通过同时直接测定底物的消耗和生物质的生成而确定的（Monod，1942）。由于能源的作用是以 ATP 的形式提供吉布斯自由能来驱动生物合成反应和聚合反应，因此 ATP 得率系数 Y_{xATP}［即合成生物质所消耗 ATP 的量（mmol $\text{ATP}\cdot\text{g}^{-1}$（干重））］与质量得率系数 Y_{sx}相比，其是细胞更基本的特性。Bauchop 和 Elsden（1960）最初的工作引入了 ATP 得率系数 Y_{xATP}。遵从上述工作十多年之后，Y_{xATP}被认为是普遍常数，其值为 95mmol $\text{ATP}\cdot\text{g}^{-1}$（干重）（Forrest 和 Walker，1971）。然而，1973 年 Stouthamer 和 Bettenhaussen 认为 ATP 形成与消耗之间呈下列线性关系

$$r_{ATP} = Y_{xATP}\mu + m_{ATP} \tag{2.27}$$

现在，这个方程是解释生长能学的权威框架，它是基于 ATP 水平的拟稳态假定。根据细胞能量水平的强调控机制和 ATP 库的高转换速率，也就是说，其松弛时间是以秒计的，而细胞生长的松弛时间是以小时计的，所以这个假设是非常合理的。因此，即使对突然的环境扰动，例如向酿酒酵母的稳态连续培养中加入一个葡萄糖脉冲，那么也能在扰动后的几分钟内达到新的稳态 ATP 水平（Theobald 等，1993）。

式（2.27）表明 ATP 的生成速率r_{ATP}［mmol $\text{ATP}\cdot\text{g}^{-1}$（干重）$\cdot\text{h}^{-1}$］与 ATP 的消耗速率是平衡的，后者表示为以下两部分之和：一部分是菌体生长的 ATP 消耗，而另一部分是与生长无关的过程（如维持）的 ATP 消耗（以 m_{ATP}表示）。实际上，与生长无关的过程的 ATP 消耗更加普遍，它包括所有与生长无关的 ATP 消耗，其中也含无效循环和其它难以说明的 ATP 应用（见方框 2.2）。与生长有关的 ATP 消耗可进一步分为三部分（Benthin 等，1994）

$$Y_{xATP}=Y_{xATP,growth}+Y_{xATP,lysis}+Y_{xAT,leak} \quad (2.28)$$

式中，$Y_{xATP,growth}$是指用于运输、生物合成和聚合的 ATP 消耗，$Y_{xATP,lysis}$是指用于已降解的大分子等进行再聚合的 ATP 消耗，$Y_{xATP,leak}$包括所有其它的 ATP 消耗，即由于渗漏、无效循环及与生长相关的维持等。

方框 2.2　用于维持的 ATP 消耗

许多细胞反应需要消耗 ATP，但并没贡献于菌体的净合成，这些反应通常称为维持反应（或过程）。其中一些维持反应与生长有关，例如用于维持细胞穿越质膜的电化学梯度，而其它的是与细胞的比生长速率无关的。因此我们需要区分与生长相关的和与生长无关的维持。与生长相关的维持的 ATP 消耗分为两种，即 $Y_{xATP,lysis}$和 $Y_{xATP,leak}$。很难把不同的过程分为与生长相关的和与生长无关的维持，但是有一些最重要的维持过程可叙述如下。

- 浓度梯度和电势梯度的维持

为确保适当的功能，细胞要维持穿越质膜以及真核细胞要穿越线粒体膜的各种浓度梯度和电化学梯度。这些过程需要吉布斯自由能，但不会导致新菌体量的合成，因此是维持过程的典型例子。这些过程中有一部分是与生长相关的，例如细胞膨胀变大时，这些梯度需要在增大着的面积（或体积）上维持；但也有一部分是与生长无关的，即当细胞不生长时梯度也需要维持。维持梯度的 ATP 消耗估计可达全部生成的 ATP 的 50%(Stouthamer，1979)。

- 无效循环

细胞内有一系列反应其净结果是 ATP 的水解。这样的一个例子是：6-磷酸果糖在磷酸果糖激酶的作用下生成 1,6-二磷酸果糖，随后 1,6-二磷酸果糖在二磷酸果糖磷酸酯酶的作用下降解成 6-磷酸果糖。这两步反应导致 ATP 的净消耗。这类循环最初被当作是代谢控制的一个缺陷（因此称为无效循环），但目前这种循环被认为是当两种酶都存在时，允许迅速调整到新环境条件的一种重要的代谢控制机制。

- 大分子的周转

为保持细胞控制代谢功能的能力，许多分子需要不断降解和合成。因此 mRNA 具有典型的几分钟的半衰期。大分子的这种连续的降解和再聚合导致了 ATP 的净消耗，而没有新生物量的产生，因此也被认为是一种维持过程。

基于对运输、生物合成和聚合的代谢消耗的估计，有可能计算出 $Y_{xATP,growth}$的理论值，但不可能从理论上估算出其它两种形式的 ATP 消耗，因此也就不能估算出用于菌体生长，总的 ATP 消耗的理论值。然而，通过把化学计量学与底物消耗速率及产物形成速率的精确测量结合起来，我们可以计算出 ATP 的生成。当生成的 ATP 作为比生长速率的函数时，可以确定 Y_{xATP}和 m_{ATP}的实验值（见例 3.3）。在好氧生长时，这需要实际的 P/O 比值。而在厌氧生长条件下，通常有可能利用代谢产物形成的测量值精确地估算出 ATP 的生成。表 2.9 列出了一些 Y_{xATP}和 m_{ATP}的实验测定值。

利用在前一部分中给出的用于运输、生物合成和聚合的代谢消耗的估计值，有可能计算出细胞合成所需的总 ATP 和 NADPH。这种计算的基础是碳源（通常是葡萄糖），而前一部分的计算基础是 12 种前体代谢物。2.3 节中已讨论过，这 12 种前体代谢物是由能量供应反应中的碳源合成的。表 2.10 列出了从 1mol 葡萄糖合成 12 种前体代谢物的化学计量系数。

表 2.9 Y_{xATP}和 m_{ATP}的实验测定值

菌 名	Y_{xATP}[①]	m_{ATP}[②]	参 考 文 献
Aerobacter aerogenes	71	6.8	Stouthamer and Bettenhaussen (1976)
	57	2.3	Stouthamer and Bettenhaussen (1976)
Escherichia coli	97	18.9	Hempfling and Mainzer (1975)
Lactobacillus casei	41	1.5	de Vries et al (1970)
Lactobacillus delbruckii	72	0	Major and Bull (1985)
Lactococcus cremoris	73	1.4	Otto et al (1980)
	53	—	Brown and Collins (1977)
	15~50	7~18	Benthin et al (1993)[③]
Lactococcus diacetilactis	47	—	Brown and Collins (1977)
Saccharomy cescerevisiae	71~91	<1	Verduyn et al (1990)

① 单位为 mmol $ATP \cdot g^{-1}$（干重）。

② 单位为 mmol $ATP \cdot g^{-1}$（干重）$\cdot h^{-1}$。

③ 根据他们的分析，Benthin et al (1993) 发现依赖于培养基组成的高能参数存在很大的变动。

如果用于形成前体代谢物、结构单元和大分子的代谢消耗已知，那么就可以计算出合成整个细胞所需的 ATP。表 2.11 列出了一个典型的细菌细胞和一个典型的真菌细胞中的结果，结果发现两种细胞的 ATP 消耗几乎相同。在细菌和真菌中，用于合成蛋白质、RNA、DNA 和糖类的 ATP 消耗几乎相同。而在真核体中，用于脂类合成的 ATP 消耗要明显高于细菌中的 ATP 消耗，这是由于真核细胞中要合成更加复杂的特殊的磷脂。还需指出，细菌中用于运输的 ATP 消耗是低的（见 2.2.3 节），净结果是用于合成细菌细胞的 ATP 需求要低于真菌细胞合成的 ATP 需求。表 2.11 中列出的总 ATP 消耗是针对所指定的大分子组成的。而且 ATP 消耗是随大分子组成的变化而改变的（见图 2.13）。因此，在产黄青霉菌中，ATP 的消耗从低比生长速率的 35mmol $ATP \cdot g^{-1}$（干重）变化到高比生长速率的 40mmol $ATP \cdot g^{-1}$（干重）（见表 2.11）（Nielsen，1997）。

表 2.10 利用葡萄糖合成 12 种前体代谢物的化学计量学

代谢前体物	葡萄糖[①]	ATP	NADH	NADPH	CO_2
6-磷酸葡萄糖	-1	-1	0	0	0
6-磷酸果糖	-1	-1	0	0	0
5-磷酸核糖	-1	-1	0	2	1
4-磷酸赤藓糖	-1	-1	0	4	2
3-磷酸甘油醛	-0.5	-1	0	0	0
磷酸甘油酸	-0.5	0	1	0	0
磷酸烯醇丙酮酸	-0.5	0	1	0	0
丙酮酸	-0.5	1	1	0	1
乙酰辅酶 A[②]	-0.5	1	2	0	0
乙酰辅酶 A+草酰乙酸[③]	-1	0	3	0	0
乙酰辅酶 A[④]	-0.5	-1	1	1	1
乙酰辅酶 A[⑤]	-0.5	-1	2	0	1
α-酮戊二酸	-1	1	4	0	1
琥珀酰辅酶 A[⑥]	-1	1	5	0	2
草酰乙酸[⑦]	-0.5	0	1	0	-1

① 所有的计量系数均指每摩尔葡萄糖。

② 通过丙酮酸脱氢酶形成（活跃于原核细胞中）。

③ 通过柠檬酸裂解酶形成。

④ 通过柠檬酸裂解酶和过量的草酰乙酸形成。

⑤ 由丙酮酸经醋酸形成。

⑥ 通过一种 NADH 连接异柠檬酸裂解脱氢酶形成。

⑦ 通过丙酮酸羧化酶形成。

表 2.11　利用基本培养基合成细菌细胞和真菌细胞的典型组成

[g·g⁻¹(干重)]和 **ATP 消耗**[mmol ATP·g⁻¹(干重)][①]

大　分　子	*E. coli*		*P. chrysogenum*	
	组　分	ATP	组　分	ATP
蛋白质	0.52	21.88	0.45	19.92
RNA	0.16	4.37	0.08	3.32
DNA	0.03	1.05	0.01	0.39
脂类	0.09	0.14	0.05	
磷脂			0.035	1.65
固醇脂			0.010	0.81
三元酰基甘油			0.005	0.30
糖类	0.17	2.06	0.25	
几丁质			0.22	2.90
糖原质			0.03	0.37
可溶解的库[②]			0.08	
氨基酸			0.04	
核酸			0.02	
代谢物			0.02	
灰分	0.03		0.08	
运输				
氨水			4.24	7.10
硫酸盐				0.14
磷酸盐		0.77		2.12
共计	1.00	34.71	1.00	39.02

① 有关*E. coli* 的数据来自于 Stouthamer (1979)，有关*P. chrysogenum* 的数据来自于 Nielsen (1997)。所做的计算都是基于在最简单的培养基上的设置，也就是说葡萄糖作为碳源和能源来源，无机盐作为其它元素的来源。

② 代谢物可溶解的库合成所需的 ATP 消耗包括在大分子的生物合成的消耗当中，比如，游离的氨基酸的生物合成的 ATP 消耗包括在蛋白质合成的 ATP 消耗当中。

参　考　文　献

Alberghina, L., Sturani, E., Costantini, M. G., Martegani, E. & Zippel, R. (1979). Regulation of macromolecular composition during growth of *Neurospora crassa* In *Fungal Walls and Hyphal Growth*, pp. 295-318. Edited by J. H. Bunnett & A. P. J. Trinci. Cambridge, UK: Cambridge Univ.

Bauchop, T. & Elsden, S. R. (1960). The growth of microorganisms in relation to their energy supply. *Journal of General Microbiology* **23**, 35-43.

Benthin, S., Schulze, U., Nielsen, J. & Villadsen, J. (1994). Growth energetics of *Lactococcus cremoris* FD1 during energy-, carbon- and nitrogen-limitation in steady state and transient cultures. *Chemical Engineering Science* **49**, 589-609.

Berry, D. R. & Berry, E. A. (1976). Nucleic acid and protein synthesis in filamentous fungi. In *The Filamentous Fungi*, Vol. Ⅱ, pp. 238-291. Edited by J. E. Smith and D. R. Berry. London: Edward Arnold.

Bisson, L. F. & Fraenkel, D. G. (1983). Involvement of kinases in glucose and fructose uptake by *Saccharomyces cerevisiae*. *Proceedings of the National Academy of Science USA* **80**, 1730-1734.

Bisson, L. F., Coons, D. M., Kruckeberg, A. L. & Lewis, D. A. (1993). Yeast sugar transporters. Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology. **28**, 259-308.

Blumenthal, H. J. (1965). Carbohydrate metabolism. 1. Glycolysis. In *The Fungi*, Vol. Ⅱ, pp. 229-268. Edited by G. C. Ainsworth & A. S. Sussman London. Edward Arnold.

Brown, W. V. & Collins, E. B. (1977). End product and fermentation balances for lactis Streptococci grown aerobically on low concentrations of glucose. *Applied Environmental Microbiology* **59**, 3206-3211.

Bruinenberg, P. M., Jonker, R., van Dijken, J. P. & Scheffers, W. A. (1985). Utilization of formate as an additional energy source by glucose limited chemostat cultures of *Candida utilis* CBS621 and *Saccharomyces cerevisiae* CBS8066. Evidence for the absence of transhydrogenase activity in yeasts. *Archives of Mikrobiology*. **142**, 302-306.

Bushell, M. E. & Bull, A. T. (1976). Growth rate dependent ribosomal efficiency of protein synthesis in the fungus *Aspergillus nidulans*. *Journal of Applied. Chemistry and Biotechnology* **26**, 339-340.

Carter, B. L. A. & Bull, A. T. (1969). Studies of fungal growth and intermediary carbon metabolism under steady state and non-steady state conditions. *Biotechnology and Bioengineering* **11**, 785-804.

Cartwright, C. P., Rose, A. H., Calderbank, J. & Keenan, M. H. J. (1989). Solute transport. In *The Yeasts*, Vol. 3, pp. 5-56. Edited by A. H. Rose & J. S. Harrison. London: Academic Press.

Conway, T. (1992). The Entner-Doudoroff pathway. History, physiology and molecular biology. *FEMS Microbioligal Reviews* **103**, 1-28.

Cook, A. H. (1958). The Chemistry and Biology of Yeasts. New York: Academic Press.

de Vries, W., Kapteijn, W. M. C., van der Beek, E. G. & Stouthamer, A. H. (1970) Molar growth yields and fermentation balances of *Lactobacillus casei* L3 in batch cultures and in continuous cultures. *Journal of General Microbiology* **63**, 333-345.

Eagon, R. G. (1963). Rate limiting effects of pyridine nucleotides on carbohydrate catabolic pathways in microorganisms. *Biochemistry and Biophysics Research Communications* **12**, 274-279.

Forrest, W. W. & Walker, D. J. (1971). The generation and utilization of energy during growth. *Advances in Microbial Physiology* **5**, 213-274.

Frenkel, E. P. & Kitchens, R. L. (1977). Purification and properties of acetyl coenzyme A synthetase from bakers yeast. *Journal of Biological Chemistry* **30**, 760-761.

Gancedo, C. & Serrano, R. (1989). Energy-yielding metabolism. In *The Yeasts*, Vol. 3, pp. 205-259. Edited by A. H. Rose and J. S. Harrison. London: Academic Press, London, UK.

Haarasilta, S. & Taskinen, L. (1977). Location of three key enzymes of glyconeogenesis in baker's yeast. *Archives of Mikrobiology* **113**, 159-161.

Hempfling, W. P. & Mainzer, S. E. (1975). Effects of varying the carbon source limiting growth on yield and maintenance characteristics of *Escherichia coli* in continuous culture. *Journal of Bacteriology* **123**, 1076-1087.

Henriksen, C. M., Christensen, L. H., Nielsen, J. & Villadsen, J. (1996). Growth energetics and metabolic fluxes in continuous cultures of *Penicillium chrysogenum*. *Journal of Biotechnology*. **45**, 149-164.

Henriksen, C. M., Nielsen, J. & Villadsen, J. (1998). Modelling the protonophoric uncoupling by phenoxyacetic acid of the plasma membrane potential of *Penicillium chrysogenum*. *submitted*.

Hoek, J. B., Rydström, J. (1988). Physiological roles of nicotinamide nucleotide transhydrogenase. *Biochemical Journal* **254**, 1-10.

Ingraham, J. L., Maaløe, O. & Neidhardt, F. C. (1983). Growth of the bacterial cell. Sunderland: Sinnauer Associated.

Jetten, M. S. M., Pitoc, G. A., Follenttie, M. T. & Sinskey, A. J. (1994). Regulation of phospho(enol)-pyruvate- and oxaloacetate-converting enzymes in *Corynebacterium glutamicum*. *Applied Microbiology and Biotechnology* **41**, 47-52.

Jones, E. W. & Fink, G. R. (1982). Regulation of amino acid and nucleotide biosynthesis in yeast. In *The Molecular Biology of the yeast* Saccharomyces. *Metabolism and Gene Expression*. pp. 181-299. Edited by J. N. Starhern, E. W. Jones & J. R. Broach. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Haibor Laboratory Press.

Kelly, J. M. & Hynes, M. J. (1982). The regulation of NADP-linked isocitrate dehydrogenase in *Aspergillus nidulans*. *Journal of General Microbiology* **128**, 23-28.

Kruckeberg, A. L. (1996). The hexose transporter family of *Saccharomyces cerevisiae*. *Archives of Microbiology* **166**, 283-292.

Lagunas, R. & Gancedo, J. M. (1973). Reduced pyridine-nucleotides balance in glucose-growing *Saccharomyces cerevisiae*. *European Journal of Biochemistry*. **37**, 90-94.

LaNoue, K. F., Schoolwerth, A. C. (1979). Metabolite transport in mitochondria. *Annual Reviews in Biochemistry and Biophysics* **52**, 93-109.

Lewis, K. F., Blumenthal, H. J., Wenner, C. E. & Weinhouse, S. (1954). Estimation of glucose catabolism pathways. *Federation Proceedings* **13**, 252.

Major, N. C. & Bull, A. T. (1985). Lactic acid productivity of a continuous culture of *Lactobacillus delbrueckii*. *Biotechnology Letters*. **7**, 401-405.

Malpartida, F. & Serrano, R. (1981). Proton translocation catalyzed by the purified yeast plasma membrane ATPase reconstituted in liposomes. *FEBS Letters* **131**, 351-354.

Marx, A., de Graaf, A. A., Wiechert, W., Eggeling, L. & Sahm, H. (1996). Determination of the fluxes in the cen-

tral metabolism of *Corynebacterium glutamicum* by nuclear magnetic resonance spectroscopy combined with metabolite balancing. *Biotechnology Bioengineering* **49**, 111-129.

Meisgeier, G. , Müller , H. , Ruhland , G. & Christner , A. (1990). Qualitative und quantitative zusammensetzung der Fettsäurespektren von selektanten des *Penicillium chrysogenum*. *Zentralblatt für Mikrobiologie* **145**, 183-186.

Mitchell, P. (1961). Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transfer by a chemisomotic type of mechanism. *Nature* **191**, 144-148.

Mitchell, P. & Moyle, J. (1965). Stoichiometry of proton translocation through the respiratory chain and adenosine triphosphatase systems or rat liver mitochondria. *Nature* **208**, 147-151.

Moat, A. G. & Foster , J. W. (1995). *Microbial physiology*. New York: Wiley-Liss.

Monod, J. (1942). Recherches sur la Croissance des Cultures Bacteriennes. Paris: Hermann et Cie.

Mounolou, J. C. (1975). The properties and composition of yeast nucleic acids. In *The Yeasts*, Vol. 2, pp. 309-334. Edited by A. H. Rose and J. S. Harrison. London: Academic Press.

Neidhardt, F. C., Ingraham, J. L., Low, K. B., Magasanik, B., Schaechter, M. & Umbarger, H. E. (1987). *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. In *Cellular and Molecular Biology*. Washington, DC: ASM.

Neidhardt, F. C., Ingraham, J. L. & Schaechter, M. (1990). Physiology of the bacterial cell. A molecular approach. Sunderland: Sinauer Associates.

Nielsen, J.(1997). Physiological engineering aspects of *Penicillium chrysogenum*. Singapore: World Scientific Publishing Co.

Nielsen, J. & Villadsen, J.(1994). *Bioreaction Engineering Principles*. New York: Plenum Press.

Nissen, T., Schulze, U., Nielsen, J. & Villadsen, J. (1997). Flux distribution on anaerobic, glucose-limited continuous cultures of *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology* **143**, 203-218.

Otto, R., Sonnenberg, A. S. M., Veldkamp, H. & Konings, W. N. (1980). Generation of an electrochemical proton gradient in *Streptococcus cremoris* by lactate efflux. *Proceedings of the National Academy of Science USA* **77**, 5502-5506.

Perlin, D. S., San Fransisco, M. J. D., Slayman, C. W. & Rosen, B. P. (1986). H^+/ATP stoichiometry of proton pumps from *Neurospora crassa* and *Escherichia coli*. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **248**, 53-61.

Ratledge, C. & Evans, C. T. (1989). Lipids and their metabolism. In *The Yeasts*, Vol. 3, pp. 367-455. Edited by A. H. Rose and J. S. Harrison. London: Academic Press.

Reed, D. J. & Wang, C. H. (1959). Glucose metabolism in *Penicillium digitatum*. *Canadian Journal of Microbiology*. **16**, 157-167.

Rose, A. H. (1976). Chemical nature of membrane components. In *The filamentous Fungi*, Vol. Ⅱ,pp. 308-327. Edited by J. E. Smith and D. R. Berry. London: Edward Arnold.

Schulze, U. (1995). Anaerobic physiology of *Saccharomyces cerevisiae*. Ph. D. Thesis, Technical University of Denmark.

Senior, A. E. (1988). ATP synthesis by oxidative phosphorylation. *Physiological Reviews* **68**, 177-231.

Shu, P. , Funk, A. & Neish, A. C. (1954). Mechanism of citric acid formation from glucose by *Aspergillus niger*. *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology* **32**, 68-80.

Stein, W. D. (1990). Channels, Carriers and Pumps. An Introduction to Membrane Transport. San Diego: Academic Press.

Stouthamer, A. H. (1979). The search for correlation between theoretical and experimental growth yields. In *International Review of Biochemistry*: *Microbial Biochemistry*, Vol. 21, pp. 1-47. Edited by J. R. Quayle. Baltimore: University Park Press.

Stouthamer,A.H. &Bettenhaussen,C.(1973). Utilization of energy for growth and maintenance in continuous and batch cultures of microorganisms. *Biochimica Biophysica Acta* **301**,53-70.

Stryer, L. (1995). *Biochemistry*, 4th ed., San Fransisco:W.H.Freeman and Company.

Sturani,E.,Martegani,F.& Alberghina,F.A.M.(1973). Inhibition of ribosomal RNA synthesis during a shift down transition of growth in *Neurospora crassa*. *Biochimica Biophysica Acta* **319**,153-164.

Tanaka, A.& Fukui, S. (1989). Metabolism of n-alkanes. In The Yeast, Vol.3,pp. 261-287. Edited by A. H. Rose and J. S. Harrison. London: Academic Press.

Theobald, U., Mailinger, W. Reuss, M. & Rizzi, M. (1993). In vivo analysis of glucose-induced fast changes on yeast adenine nucleotide pool applying a rapid sampling technique. *Analytical Biochemistry* **214**, 31-37.

Umbarger, H. E. (1978). Amino acid biosynthesis and its regulation. *Annual Reviews in Biochemistry* **47**, 1127-1162.

Umezawa, C. , Kishi, T. (1989). Vitamin metabolism. In *The Yeasts*, Vol.3,pp. 457-488. Edited by A. H. Rose and J.

S. Harrison. London: Academic Press.
Verduyn, C., Postma, E., Scheffers, W. A. & van Dijken, J. P. (1990). Energetics of Saccharomyces cerevisiae in anaerobic glucose limited chemostat cultures. *Journal of General Microbiology* **136**, 405-412.
Verduyn, C., Postma, E., Scheffers, W. A. & van Dijken, J. P. (1992). Effect of benzoic acid on metabolic fluxes in yeast. A continuous culture study on the regulation of respiration and alcoholic fermentation. Yeast **8**, 501-517.
Voet, D., Voet, J. G. (1995). *Biochemistry*, 2nd ed. New York: John Wiley & Sons.
von Jagow, G., Klingenberg, M. 1970. Pathways of hydrogen in mitochondria of *Saccharomyces carlsbergensis*. *European Journal of Biochemistry* **12**, 583-592.
Walker, P. & Woodbine, M. (1976). The biosynthesis of fatty acids. In *The Filamentous Fungi*, Vol. Ⅱ, pp. 137-158. Edited by J. E. Smith and D. R. Berry. London: Edward Arnold.
Wang, C. H., Stern, I., Gilmour, C. M., Klungsoyr, S., Reed, D. J., Bialy, J. J., Christensen, B. E. & Cheldelin, V. H. (1958). Comparative study of glucose catabolism by radiorespirometric method. *Journal of Bacteriology* **76**, 207-216.
Watson, K. (1976). The biochemistry and biogenesis of mitochondria. In *The Filamentous Fungi*, Vol. Ⅱ, pp. 92-120. Edited by J. E. Smith and D. R. Berry. London: Edward Arnold.
Zubay, G. (1988). *Biochemistry*, 2nd ed. New York: Macmillan.

第3章　细胞反应的综合模型

在上一章中讨论了一些主要的代谢途径，通过这些途径碳-能源分解代谢成代谢合成及细胞生长所需的自由能及碳架。为了完整地描述中间代谢，需向第2章中复杂的代谢途径中补充各个反应的化学计量学、动力学及热力学等信息。主要涉及反应及代谢途径可行性问题的热力学将在第14章详细讨论。关于反应动力学，尤其是在体内条件下的动力学信息是特别难获得的，但这样的信息对于理解代谢通量控制是必需的。代谢通量控制是代谢工程当然也是本书的一个中心问题。从大量的中间代谢研究中很容易得到各个单个反应的化学计量式，将其扩展到整个代谢途径就提供了建立能量、物质平衡及解释相互耦联的反应和途径之间相互作用的基础。代谢途径的化学计量学提出了某些必须通过细胞培养测定才能满足的限制条件，由此而引出下一章将要讨论的数据一致性问题。

本章将讨论通过汇集细胞中所有的反应以提供细胞代谢的综合模型的方法。显然，仅能考虑所有可能反应中的一少部分，因为其中很多反应甚至还不知道，或将其包括就有可能产生难以处理的大系统。同时，还不清楚增加代谢反应描述的细节能把细胞模型的精确度及实用性提高到什么程度。尽管有许多方法可进行反应的汇集，但其合理性及一致性是最重要的。本章将为构建细胞模型的化学计量学提供一个框架，它也适用于分析很大的反应网络。

3.1　细胞反应的化学计量学

所有细胞反应的最终结果是底物转变为自由能和代谢产物（如初级代谢物）、或更复杂的产物（如次级代谢物）、胞外蛋白、生物质组分如细胞蛋白、RNA、DNA及脂类等。这些转化反应是经由大量的代谢物进行的，这些代谢物包括代谢前体物及合成大分子库的结构单元。若要分析这个巨大的反应组，就必须详细说明其化学计量学，这将以一个通用的方式进行。为此，有必要区分底物、代谢产物、胞内代谢物及生物质组分，本书对其定义如下。

- 底物　指存在于无菌培养基中的物质，能被细胞进一步代谢或直接结合进细胞中。用如此广的定义，底物的数量通常很多，范围从碳、氮及能源到对细胞功能所必需的各种矿物质。在绝大多数情况下，仅考虑碳、氮及能源物质。由于葡萄糖通常作为碳源及自由能的来源，因此所考虑的底物的种类通常很少（葡萄糖、氨，或许还有氧）。

- 代谢产物　指由细胞生成并分泌至培养基中的物质。它或者是初级代谢产物，如二氧化碳、乙醇、乙酸、乳酸等；或者是更复杂的次级代谢产物；或者是分泌到胞外培养基中的异源蛋白。

- 生物质组分　指构成生物质的大分子库（或者是一个单个的大分子），包括真正的细胞组分如RNA、DNA、蛋白质、脂类、糖类等的大分子库，还包括积累在细胞内的大分子产物，如多糖、生物聚合物或未分泌的异源蛋白。

- 胞内代谢物　指一类包括在细胞内的所有其它物质。因此，它既包括不同代谢途径的中间产物，如糖酵解中间产物，也包括用于大分子合成的结构单元，如氨基酸等。

上述在生物质组分和胞内代谢物之间所作的区分不同于根据它们在细胞反应中转换的时间尺度所对应的胞内化合物。与大分子相比，小分子物质如糖酵解中间产物库（还有氨基

酸）有非常快的转换（见例 8.1）。因此它们符合拟稳态假设（见第 8 章）。另一方面，在瞬态生长过程中，生物质组分随时间变化缓慢。在某些时候很难断定某物质是作为胞内代谢物还是代谢产物。例如，酿酒酵母糖酵解途径的通量很高时，丙酮酸能积累并分泌至胞外，而当糖酵解通量由于葡萄糖浓度降低而减少时，菌体可重新吸收利用丙酮酸进行代谢反应。很明显丙酮酸是一个途径的中间代谢物，但由于它被分泌至胞外，所以也可作为代谢产物。在本书中，我们将这类物质视为代谢产物。因此，在菌体培养过程中的任一时刻，凡在培养基中所能检测到的物质均应视为底物或代谢终产物。

下面两个例子将说明上述分类，第一个例子是通过活跃在许多细菌中的磷酸转移酶系统(PTS）吸收葡萄糖。实际的 PTS 运输机理涉及到许多酶（见 2.2.3 节），但为了讨论方便，通过下列总的化学计量反应式将 PTS 概括为：

$$\underset{\text{(葡萄糖)}}{\text{glucose}} - \underset{\text{(磷酸烯醇丙酮酸)}}{\text{PEP}} + \underset{\text{(6-磷酸葡萄糖)}}{\text{glucose-6-phosphate}} + \underset{\text{(丙酮酸)}}{\text{pyruvate}} = 0 \tag{3.1}$$

另一个例子是由结合 NADPH 的谷氨酸脱氢酶所催化的氨的吸收同化（见 2.4.1 节），其计量反应式为：

$$\underset{(\alpha\text{-酮戊二酸})}{\alpha\text{-ketoglutarate}} - NH_3 - NADPH - H^+ + \underset{\text{(L-谷氨酸)}}{\text{L-glutamate}} + NADP^+ + H_2O = 0 \tag{3.2}$$

在上述反应式中，在正反应中的物质（作为反应物）的计量系数为负，而在正反应中生成物的计量系数为正。除符号之外，这些计量系数还提供了重要的信息，例如 1mol 葡萄糖的吸收及磷酸化消耗了 1mol PEP，同时生成 1mol 丙酮酸。

为了用通式表示，底物、代谢产物及胞内中间代谢物的化学计量系数分别以 α、β、g 来表示。需要注意的是：底物的化学计量系数一般为负，代谢产物为正，而中间代谢物可正可负。尽管谷氨酸和 α-酮戊二酸是细胞生物质的组分，但根据上述定义，在反应（3.2）中可认为它们是胞内中间代谢物。在这些例子中，没有考虑生物质，但在通常情况下，其化学计量系数以 γ 表示。2.4.2 节推导了合成生物质大分子组分的总化学计量反应式，正是在这些反应中以 γ 表示细胞组分的计量系数使其与参加其它代谢反应的胞内代谢物被区分开。

定义了底物、代谢产物、胞内代谢物、生物质组分的化学计量系数之后，现在可重新审视反应（3.1）与反应（3.2）。显然葡萄糖和氨是底物，除质子和水之外，所有其它物质是胞内代谢物。因此在反应（3.1）中 α_{glc}及 g_{PEP}为 -1，反应（3.2）中 g_{glut}为 1。尽管由于质子和水的含量与其它细胞组分中相比独占优势从而不被包括在反应计量式中，但它们仍可被视为代谢产物。

现继续说明如何建立细胞反应的一般化学计量反应式。为此，考虑某一 N 个底物转化为 M 个代谢产物及 Q 个生物质组分的系统，转化反应在 J 个反应进行，其中 K 个胞内代谢物作为途径中间产物参与反应。化学反应计量系数的下标用两个字母分别表示反应数及反应物质，例如 α_{ji}是第 i 个底物在第 j 个反应中的计量系数。在普遍化的化学反应计量式中，我们引入化学计量系数，对应于全部反应中每步反应的底物、代谢产物、胞内代谢物以及生物质组分。由于有的物质没有参与某一反应，因此有许多计量系数为零。如在反应（3.2）中，葡萄糖的计量系数就为零。底物、代谢产物及生物质组分分别用 S_i、P_i、$X_{macro,i}$表示，另外，K 个途径的中间产物以 $X_{met,i}$表示。在此定义下，第 j 个细胞反应的化学反应计量式为：

$$\sum_{i=1}^{N} \alpha_{ji} S_i + \sum_{i=1}^{M} \beta_{ji} P_i + \sum_{i=1}^{Q} \gamma_{ji} X_{macro,i} + \sum_{i=1}^{K} g_{ji} X_{met,i} = 0 \tag{3.3}$$

在代谢模型中，J 个细胞反应中的每一个反应均可得到像式（3.3）一样的计量式，因

此可以很方便地用矩阵以很简洁的形式将所有 J 个反应的化学计量式表示为：

$$\mathbf{AS}+\mathbf{BP}+\mathbf{\Gamma X}_{\text{macro}}+\mathbf{GX}_{\text{met}}=\mathbf{0} \tag{3.4}$$

这里，**A**、**B**、**Γ** 及 **G** 分别表示 J 个反应中底物、代谢产物、生物质组分、途径中间代谢物的计量系数矩阵。其中矩阵中的行代表反应，列代表代谢物。因此，矩阵 **A** 的第 j 行及第 i 列的元素就代表着第 j 个反应中的第 i 个底物的化学反应计量系数。前面已讨论过，计量系数可正、可负或为零。对于式（3.4）这样通用型的化学计量式，许多计量系数变为零。尽管确定模型中所有反应和所有物质的计量系数比较繁琐，但矩阵形式的优点是能对矩阵进行运算，从而便于随后的分析（对矩阵的表示法及运算不熟悉者可参看方框 4.2）。另外，以矩阵表示化学计量反应式，很容易得到不同化合物参与各种反应的概况，因为只需察看该物质在特定的矩阵中所处的那一列即可。化学计量系数矩阵的列汇集了某一特定物质在所有 J 个反应中的计量系数。通过例 3.1 可说明这一点，在此例中根据方程式（3.3）及式（3.4），建立了大肠杆菌混合酸发酵的化学计量反应式。

在细胞反应中有一些辅助因子对，其中 ATP/ADP、NAD^+/NADH 及 $NADP^+$/NADPH 是最重要的。辅助因子对中的两种物质的计量系数通常大小相等，符号相反，例如在反应（3.2）中，NADPH 及 $NADP^+$ 的化学计量系数分别为 -1 和 1。因而，这些辅助因子的不同形式的胞内浓度是密切相关的，例如在任何反应中，NADPH 及 $NADP^+$ 浓度的总和是恒定的。若化学计量反应式含有某一辅助因子对，在其计量系数矩阵 G 中将产生线性相关的列，即某一列是其它列的线性组合，这将在随后的分析中产生问题。由于辅助因子对之间是直接相关的，因此没有必要同时考虑它们两个。在所有情况下，我们仅考虑辅助因子对中的一个即可。但有一点很值得注意，即如果只考虑某一辅助因子对中的一个物质，那么它们之间的相互转化也应遵循同一原则，如 ATP 与 ADP 之间的相互转化。若在某些反应中另外的化合物是由此辅助因子对之一形成的，如从 ATP 生成 AMP，就有必要将其计量系数考虑进去，这与 2.6 节中能耗的计算相似，它是以 ATP 生成 ADP 作为基础的。在某些情况下，不能直接识别是否保存着像辅助因子对中一半的物质，但通过检验计量矩阵中行的相关性就可确认。

【例 3.1】 大肠杆菌的混合酸发酵

大肠杆菌是一个兼性厌氧菌，它调节着一个较复杂的发酵过程，通常称该过程为混合酸发酵。在此过程中，共生成七种代谢产物，除琥珀酸是由磷酸烯醇丙酮酸生成之外，其余均由丙酮酸生成。琥珀酸是经草酰乙酸生成的，而草酰乙酸经谷氨酸转氨反应生成天冬氨酸（1 分子 NADPH 及一分子氨用于 α-酮戊二酸再生为谷氨酸，因此它们在图 3.1 中是作为反应物），天冬氨酸脱氨生成延胡索酸，再经延胡索酸脱氢酶（它与作用方向相反的琥珀酸脱氢酶不同）还原为琥珀酸。图 3.1 描述了混合酸发酵的关键步骤，表 3.1 列出了某些典型产物的得率。建立化学计量模型的目的是为了说明在一个典型的大肠杆菌细胞中进行分解代谢反应时培养基中代谢物的净变化。

我们现在建立一个简单的混合酸发酵的代谢模型。为了将不必要的复杂性减至最低，不考虑糖酵解的所有中间产物。因此，葡萄糖至磷酸烯醇丙酮酸的转化可汇集成一个具有如下化学计量关系的总反应：

$$-\frac{1}{2}\text{glucose}+\text{PEP}+\text{NADH}=0 \tag{1}$$

表 3.1　大肠杆菌混合酸发酵典型产物的得率

代谢产物	每 100 mol 葡萄糖发酵生成产物的量/mol	代谢产物	每 100 mol 葡萄糖发酵生成产物的量/mol
甲酸	2.4	乙醇	49.8
乙酸	36.5	CO_2	88.0
乳酸	79.5	H_2	75.0
琥珀酸	10.7		

注：数据来自于 Ingraham et al (1983)。

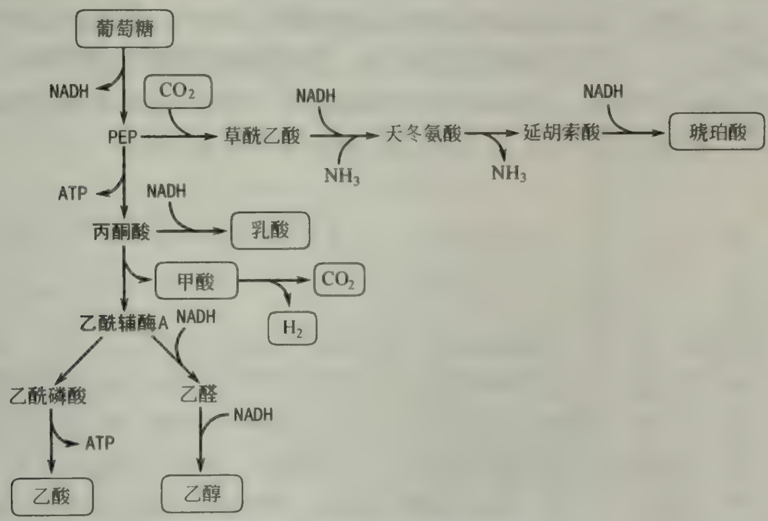


图 3.1　大肠杆菌混合酸发酵

底物（葡萄糖）及 7 种代谢产物置于方框中，代谢模型中的胞内代谢物和辅助因子为黑体。从草酰乙酸形成天冬氨酸的转氨反应以直接氨化表示，为了减少复杂性就没有列出谷氨酸及 α-酮戊二酸

琥珀酸生成途径中的中间产物，如草酰乙酸、天冬氨酸、延胡索酸均省略。另外，NADH 和 NADPH 被汇集在一个单个还原力库，这在本质上表明用于将草酰乙酸转变为天冬氨酸的谷氨酸再生过程中，只以 NADH 而不是 NADPH 作为辅助因子。因此，磷酸烯醇丙酮酸转化至琥珀酸的总化学计量反应式为：

$$-\mathrm{PEP}-\mathrm{CO_2}-2\mathrm{NADH}+\underset{(\text{琥珀酸})}{\mathrm{succinate}}=0 \tag{2}$$

磷酸烯醇丙酮酸转化至丙酮酸及其进一步转化生成乳酸、甲酸、乙酰辅酶 A 的计量反应式可直接从图 3.1 得到：

$$-\mathrm{PEP}+\mathrm{pyruvate}+\mathrm{ATP}=0 \tag{3}$$

$$-\mathrm{pyruvate}-\mathrm{NADH}+\underset{(\text{乳酸})}{\mathrm{lactate}}=0 \tag{4}$$

$$-\mathrm{pyruvate}+\underset{(\text{乙酰辅酶 A})}{\mathrm{acetyl\text{-}CoA}}+\underset{(\text{甲酸})}{\mathrm{formate}}=0 \tag{5}$$

同样，甲酸水解为 CO_2 和 H_2 可写为：

$$-\mathrm{formate}+\mathrm{CO_2}+\mathrm{H_2}=0 \tag{6}$$

最后，还需列出生成乙酸和乙醇的代谢途径的计量反应式。省略中间产物（乙酰磷酸和乙

醛）后，总计量反应式变为：

$$-\text{acetyl-CoA}+\underset{（乙酸）}{\text{acetate}}+\text{ATP}=0 \tag{7}$$

$$-\text{acetyl-CoA}-2\text{NADH}+\underset{（乙醇）}{\text{ethanol}}=0 \tag{8}$$

至此，大肠杆菌混合酸发酵可用上述 8 个总反应式来表示。值得注意的是，在此过程中省略了代谢途径中直线部分的所有中间产物，而只考虑了分支点处的代谢物。之所以这样做是对所有胞内代谢物作拟稳态假设的结果，在第 8 章将详细讨论。

根据式（3.4）的矩阵表示法可对上述 8 个方程进行分类。葡萄糖为底物，琥珀酸、CO_2、乳酸、甲酸、H_2、乙酸及乙醇为代谢产物，磷酸烯醇丙酮酸、丙酮酸、乙酰辅酶 A、ATP 及 NADH 为胞内代谢物。此模型不含生物质组分，这是因为没有涉及到合成反应而仅考虑了供能反应。据此由反应（1）～反应（8）的化学计量式，可得

$$\underset{\mathrm{A}}{\begin{pmatrix}-\frac{1}{2}\\0\\0\\0\\0\\0\\0\\0\end{pmatrix}}S_{glc}+\underset{\mathrm{B}}{\begin{pmatrix}0&0&0&0&0&0&0\\1&-1&0&0&0&0&0\\0&0&0&0&0&0&0\\0&0&1&0&0&0&0\\0&0&0&1&0&0&0\\0&1&0&-1&1&0&0\\0&0&0&0&0&1&0\\0&0&0&0&0&0&1\end{pmatrix}}\begin{pmatrix}P_{suc}\\P_{CO_2}\\P_{lac}\\P_{for}\\P_{H_2}\\P_{ac}\\P_{et}\end{pmatrix}+\underset{\mathrm{G}}{\begin{pmatrix}1&0&0&0&1\\-1&0&0&0&-2\\-1&1&0&1&0\\0&-1&0&0&-1\\0&-1&1&0&0\\0&0&0&0&0\\0&0&-1&1&0\\0&0&-1&0&-2\end{pmatrix}}\begin{pmatrix}X_{PEP}\\X_{Pyr}\\X_{AcCoA}\\X_{ATP}\\X_{NADH}\end{pmatrix}=\begin{pmatrix}0\\0\\0\\0\\0\\0\\0\\0\end{pmatrix} \tag{9}$$

式（9）提供了所考虑反应的方便概况。因此，通过察看最后一个计量系数矩阵 G 中的第四列，可看出只有两个反应生成 ATP，即磷酸烯醇丙酮酸转化至丙酮酸［反应（3）］及乙酰辅酶 A 转化至乙酸的反应［反应（7）］。因为这两个反应的通量是可测的（至乙酸的通量可通过乙酸的生成速率直接测量，磷酸烯醇丙酮酸至丙酮酸的通量可通过直接测量除琥珀酸之外所有代谢产物的生成速率之和、或者葡萄糖吸收速率与琥珀酸形成速率之差来获得），所以就可获得 ATP 总合成速率的信息。由于在厌氧条件下，无其它来源提供 ATP，因此也可用后者估算用于菌体生长及维持的 ATP 消耗速率。此外，由于葡萄糖转化为不同的代谢物时必须达到氧化还原平衡（或相当于 NADH 平衡），葡萄糖的吸收必须与琥珀酸、乳酸及乙醇的形成有关。因此，利用表 3.1 的数据以及胞内代谢产物计量系数矩阵中的最后一列数据，就可得到每 100 mol 葡萄糖消耗的 NADH 为：

$$2\times10.7+79.5+2\times49.8=200.5$$

这与每 100mol 葡萄糖转化为磷酸烯醇丙酮酸而生成的 200mol NADH 非常吻合。

3.2 反应速率

3.1 节中的化学计量反应式表明了 J 个胞内反应中每一个反应生成或消耗物质的量，但不能计算出代谢产物分泌至培养基的速率或相对数量。通过引入单个反应的速率并进一步将其耦联起来就可确定产物分泌的总速率。某一化学反应的速率用正反应速率（或速度）v 表示，它指计量系数为 β 的化合物的生成速率是 βv。通常，每个反应的某一化学计量系数可

任意定为1，因此在特定的反应中，正反应速率就等于该物质的消耗或生成速率，例如，反应（3.1）的速率就等于通过 PTS 系统的葡萄糖的吸收速率。为此，正反应速率的单位通常表示为 $mol \cdot h^{-1}$，当考虑到体积的因素时，其单位可表示为 $mol \cdot (L \cdot h)^{-1}$。对于细胞反应，常以生物质作为参考，定义所谓的比速率，其单位为 $mol \cdot g^{-1}$（干重）$\cdot h^{-1}$。将3.1节中 J 个反应的正反应速率汇集于速率向量 $\mathbf{v}$ 中，那么 $\beta_{ji}v_j$ 就表示第 j 个反应中的第 i 个代谢产物的比生成速率。由于底物的计量系数（即矩阵 $\mathbf{A}$ 的元素）通常为负，则第 j 个反应中第 i 个底物的比转化速率就为 $-\alpha_{ji}v_j$。若要计算某物质的总生成速率或消耗速率，则必须将其在不同反应中的贡献相加。例3.1的大肠杆菌混合酸发酵可说明此点：在一个反应（甲酸脱羧基反应）生成的 CO_2 被用于另一反应（磷酸烯醇丙酮酸的羧化反应），显然 CO_2 的总生成速率由这两个反应的相对速率确定。因此，第 i 个底物的净比吸收速率可用其在所有 J 个反应中的消耗率之和来表示：

$$r_{s,i} = -\sum_{j=1}^{J} \alpha_{ji}v_j \tag{3.5}$$

同样，第 i 个代谢产物的净比生成速率为：

$$r_{p,i} = -\sum_{j=1}^{J} \beta_{ji}v_j \tag{3.6}$$

式（3.5）及式（3.6）说明在可直接测定的底物比吸收速率、产物比生成速率与不可直接测定的不同的胞内反应速率之间有着重要的关系。通常以通量代表后者用以说明它们是通过途径而非单个反应的速率。若某物质仅在一个反应中生成，其消耗或生成速率的测量就是这个反应速率的一个间接测量。因此，回到例3.1大肠杆菌混酸发酵的例子，可以看到，乙酸的生成速率就等于从乙酰辅酶A经磷酸乙酰至乙酸的通量。换言之，本例中的第七个反应的速率（或通量）可通过测定乙酸的生成速率进行计算。

与式（3.5）及式（3.6）相似，对生物质组分及胞内代谢物，可得出：

$$r_{\text{macro},i} = \sum_{j=1}^{J} \gamma_{ji}v_j \tag{3.7}$$

$$r_{\text{met},i} = \sum_{j=1}^{J} g_{ji}v_j \tag{3.8}$$

这些速率不像底物比吸收速率及产物比生成速率那样容易进行实验测定。式（3.7）、式（3.8）中的速率是净比生成速率，并且可通过胞内组分的测量对其进行量化。因此，一个物质可以在一个反应中消耗，而在另一反应生成。式（3.7）与式（3.8）中左边的速率就是在全部 J 个胞内反应中该物质生成及消耗的净结果。若速率 $r_{\text{met},i}$ 为正，则表示第 i 个胞内代谢物的净生成，若为负，则为净消耗，如果速率为零，就表明在 J 个反应中，生成与消耗比速率正好互相平衡（这种平衡是代谢通量分析的基础，在第8章～第10章将详细讨论）。

式（3.5）～式（3.8）的加和方程可用矩阵表示如下：

$$\mathbf{r}_s = -\mathbf{A}^T\mathbf{v} \tag{3.9}$$

$$\mathbf{r}_p = \mathbf{B}^T\mathbf{v} \tag{3.10}$$

$$\mathbf{r}_{\text{macro}} = \mathbf{\Gamma}^T\mathbf{v} \tag{3.11}$$

$$\mathbf{r}_{\text{met}} = \mathbf{G}^T\mathbf{v} \tag{3.12}$$

这里比速率向量 $\mathbf{r}_s$ 包括 N 个比底物吸收速率，$\mathbf{r}_p$ 包括 M 个比产物生成速率。

【例 3.2】 大肠杆菌混合酸发酵的比速率

现在将例 3.1 中 8 个反应的速率以 $v_1 \sim v_8$ 表示，则立即可得出葡萄糖比吸收率为：

$$r_{glc}=\frac{1}{2}v_1 \tag{1}$$

当然通过式（3.9）也可得到该结果：

$$r_{glc}=-\left(-\frac{1}{2} \quad 0 \quad 0 \quad 0 \quad 0 \quad 0 \quad 0 \quad 0\right)\begin{pmatrix} v_1 \\ v_2 \\ v_3 \\ v_4 \\ v_5 \\ v_6 \\ v_7 \\ v_8 \end{pmatrix}=\frac{1}{2}v_1 \tag{2}$$

因此，如果知磷酸烯醇丙酮酸的通量以 v_1 表示，则其等于葡萄糖比吸收速率的2 倍。

同样可得到代谢产物的比生成速率，例如对于 CO_2 来说：

$$r_{CO_2}=v_6-v_2 \tag{3}$$

由于 H_2 的比生成速率一定等于 v_6，琥珀酸的比生成速率一定等于 v_2，则 CO_2 生成速率应等于上述两个速率之差，这一点可作为限制条件用以检验数据的一致性。注意表 3.1 中的数据似乎不一致，因为每代谢 100mol 葡萄糖形成的 CO_2 多于 H_2，这或是由于实验误差，或是由于模型太简单造成的。

在这样简单的模型中，很容易直接从单个反应速率与底物比吸收速率及产物比生成速率之间推导出相互关系（不必用矩阵形式）。然而对胞内代谢物却不是这样，因为它们可以参与几个不同的反应。因此，对于所考虑的 5 个胞内代谢物，可得如下结果：

$$\begin{pmatrix} r_{PEP} \\ r_{Pyr} \\ r_{AcCoA} \\ r_{ATP} \\ r_{NADH} \end{pmatrix}=\begin{pmatrix} 1 & -1 & -1 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 1 & -1 & -1 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 1 & 0 & -1 & -1 \\ 0 & 0 & 1 & 0 & 0 & 0 & 1 & 0 \\ 1 & -2 & 0 & -1 & 0 & 0 & 0 & -2 \end{pmatrix}v=\begin{pmatrix} v_1-v_2-v_3 \\ v_3-v_4-v_5 \\ v_5-v_7-v_8 \\ v_3+v_7 \\ v_1-2v_2-v_4-2v_8 \end{pmatrix} \tag{4}$$

如例 3.1 中所讨论的，r_{ATP}可视为磷酸烯醇丙酮酸至丙酮酸的通量与丙酮酸至乙酸的通量之和。

3.3 动态质量平衡

在前一节中，推导出了关联胞内反应速率与底物吸收速率及产物生成速率的方程式。后者可通过实验测定底物及代谢产物浓度得到。在讨论如何通过这些测量求得比速率之前，有必要考虑生物反应器的动态，因为这样的测量通常是在生物反应器中进行的。图 3.2 是生物反应器的一般表示，其体积为 V（L），新鲜无菌培养基以 F_{in}（$L \cdot h^{-1}$）的流率进入反应器，用过的培养基以 F_{out}（$L \cdot h^{-1}$）的流率流出反应器。反应器中的培养基假定处于完全（或理想）混合状态，即不同培养基组分的浓度不随空间位置变化。对于小体积的生物反应

器（<1L，包括摇瓶），经通气及搅拌可达此目的。而对于实验室的搅拌生物反应器（1～10L），为了保证反应器内培养基处处均匀一致，需引入一些特殊设计（Sonnleitner and Fiethter 1988；Nielsen and Villadsen 1993）。并不是所有的生物反应器都涉及到培养基的连续流动，其可有几种不同的操作方式，现仅考虑三种最常用的方式：

- 分批式，$F_{in}=F_{out}=0$，即培养液体积恒定，它是传统的发酵操作方式，而且由于实验设施相对简单，也为许多生命科学家所使用。分批式实验具有操作简单、在短时间内能获得大量实验数据的优点。其缺点是：由于整个实验过程的动态变化，即细胞所经历的环境条件随时间而变化，使得解释实验数据变得困难。若使用装备精良的生物反应器，那么至少某些变量如 pH 及溶解氧等，可控制在恒定水平。

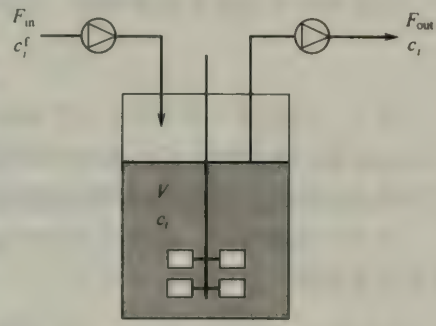


图 3.2　具有流加入新鲜无菌培养基及移出反应过的培养基装置的生物反应器
c_i^f—加料液中第 i 个化合物的浓度；
c_i—流出培养基中第 i 个化合物的浓度
（假设该反应器中的物料完全（或理想）混合，那么流出培养基中每种化合物的浓度就等于它们在反应器中的浓度）

- 连续式，$F_{in}=F_{out}\neq 0$，培养液体积恒定。典型的连续式生物反应器称为恒化器，所设计的加料培养基中有一种限速底物，以允许生物质的比生长速率在可控制的范围内变化。连续式生物反应器的优点是可获得稳态的操作条件，允许在非常确定的环境条件下精确地测定比速率。通过改变加料速率，可进一步改变实验条件，由此可得到环境条件对细胞生理影响的有用信息。连续式生物反应器的缺点是：需要准备大量新鲜无菌的培养基，因此劳动强度大，而且经过很长时间才能达到稳定状态。尽管连续操作有优点，但在工业化生产中极少使用，这是因其对污染敏感，如经由加料流的污染。此外，对遗传不稳定性也敏感，可导致快速生长的突变株产生，在与生产菌株竞争中处于优势。连续式操作的其它例子是恒 pH 器，它是通过调节加料流以维持生物反应器的 pH 恒定。还有恒浊器，调节加料流以维持生物量浓度恒定。

- 流加式（或半间歇式），$F_{in}\neq 0$，$F_{out}=0$，即反应体积增加。这也许是在工业生产中最常用的一种方法，因为它允许环境条件的控制，例如使葡萄糖浓度维持在某种水平，能产生很高的效价（代谢产物浓度可高达每升几百克），这对下游处理非常重要。同时，流加操作是一种很方便的能维持稳定环境条件的实验系统，尽管稳定期有限，它便于进行细胞生理研究。

对于图 3.2 所示的生物反应器，第 i 个底物的动态质量平衡式如下（推导见方框 3.1）：

底物积累速率 = − 底物消耗速率 + 底物添加速率 − 底物流出速率

$$\frac{dc_{s,i}}{dt}=-r_{s,i}x+D(c_{s,i}^{f}-c_{s,i}) \tag{3.13}$$

式中，$c_{s,i}$ 为生物反应器中第 i 个底物的浓度（$mol\cdot L^{-1}$）；$c_{s,i}^{f}$ 为加料中第 i 个底物的浓度（$mol\cdot L^{-1}$）；$r_{s,i}$ 为第 i 个底物的比消耗速率；x 为生物质的质量浓度［g^{-1}（干重）·L^{-1}］；D 是所谓的稀释速率（h^{-1}），分批式操作的 D 为零。恒化器及流加式操作的稀释速率如下：

$$D=\frac{F}{V} \tag{3.14}$$

在方程式（3.13）中，右边第一项是底物消耗的体积速率，它等于底物的比消耗速率乘以生物质浓度。第二项涉及生物反应器底物的加料及出料。式左边为积累项，它表示底物随时间的变化率，在分批式反应器中，它等于底物的体积消耗速率。稳定状态时，积累项为零，因此底物的体积消耗速率就等于稀释速率乘以流入及流出反应器的底物浓度之差。

与底物的动态质量平衡相似，代谢产物的平衡方程为：

$$\frac{\mathrm{d}c_{p,i}}{\mathrm{d}t}=r_{p,i}x+D(c_{p,i}^{f}-c_{p,i}) \tag{3.15}$$

式中，右边第一项为第 i 个产物的体积生成速率，通常无菌加料中代谢产物不存在，所以 $c_{p,i}^{f}$为零，在此情况下稳态时产物体积生成速率等于稀释速率乘以反应器中的代谢产物浓度（该浓度也等于流出反应器的代谢产物浓度）。

对于生物质组分，通常以生物质为参照，即浓度是以生物质作为基准，此时可得如下的质量平衡方程（推导见方框 3.1）：

$$\frac{\mathrm{d}X_{macro,i}}{\mathrm{d}t}=r_{macro,i}-\mu X_{macro,i} \tag{3.16}$$

式中，$X_{macro,i}$为第i 个生物质组分的浓度；μ 为比生长速率（h^{-1}）。生物质组分浓度可用不同单位来表示，但通常为 $g \cdot g^{-1}$（干重）。用这些单位可以表明，所有生物质组分浓度之和等于 1：

$$\sum_{i=1}^{Q} X_{macro,i}=1 \tag{3.17}$$

此外，上述单位与经实验测定的细胞大分子组成一致，该组成通常以质量分数表示（见表 2.11）。从式（3.16）中可看出生物质组分的质量平衡与生物反应器操作方式无关，因为稀释速率没直接出现在质量平衡方程中。但它与该方程中的最后一项有间接关系，最后一项表示由于生长而使生物质膨胀时生物质组分的稀释。因此假如没有大分子库的净合成（$r_{macro,i}=0$）而生物质仍发育长大（$\mu>0$）时，其胞内水平将降低。利用方程式（3.17），比生长速率等于所有生物质组分的净生成速率之和（见方框 3.1）：

$$\mu=\sum_{i=1}^{Q} r_{macro,i} \tag{3.18}$$

方框 3.1　动态质量平衡方程的推导

在此将说明底物及生物质组分质量平衡方程的推导。代谢产物及胞内产物的质量平衡方程可类似导出。

底物

现考虑第 i 个底物，其通过加料流进入生物反应器并被反应器中细胞消耗，该化合物的质量平衡式为：

$$\frac{\mathrm{d}(c_{s,i}V)}{\mathrm{d}t}=-r_{s,i}xV+Fc_{s,i}^{f}-F_{out}c_{s,i} \tag{1}$$

式中，$r_{s,i}$为物质i 的比消耗速率 [$mol \cdot g^{-1}$（干重）$\cdot h^{-1}$]；$c_{s,i}$为其在反应器中的浓度（假设等于出口的浓度 $mol \cdot L^{-1}$）；$c_{s,i}^{f}$为其在加料流中的浓度（$mol \cdot L^{-1}$）；x 是反应器中生物质的质量浓度 [g（干重）$\cdot L^{-1}$]。方程式（1）中的第一项是累积项，第二项是消耗项（或反应项），第三项是供给项，最后一项是该化合物的移出速率。重新安排方程式（1）可得到：

$$V\frac{dc_{s,i}}{dt}+c_{s,i}\frac{dV}{dt}=-r_{s,i}xV+Fc_{s,i}^{f}-F_{out}c_{s,i} \tag{2}$$

方程两侧同除以 V 后得到：

$$\frac{dc_{s,i}}{dt}=-r_{s,i}x+\frac{F}{V}c_{s,i}^{f}-\left(\frac{F_{out}}{V}+\frac{1}{V}\times\frac{dV}{dt}\right)c_{s,i} \tag{3}$$

对于流加式反应器：

$$F=\frac{dV}{dt} \tag{4}$$

而且由于 $F_{out}=0$，则方程式（3）括弧中的项就等于稀释速率。对于连续式操作的反应器，培养液体积恒定，并且 $F=F_{out}$，所以括弧中的项也等于稀释速率。于是方程式（2）就还原为适用于任何操作形式的质量平衡方程式（3.13）。

生物质组分

生物质组分的质量平衡方程为（假设加料流无菌）：

$$\frac{d(X_{macro,i}xV)}{dt}=r_{macro,i}xV-F_{out}X_{macro,i}x \tag{5}$$

式中，X_ix 是生物反应器中第 i 个生物质组分的质量浓度（$g\cdot L^{-1}$）；$r_{macro,i}$ 为其比净生成速率。重排方程式（5）后得到：

$$\frac{dX_{macro,i}}{dt}=r_{macro,i}-\left(\frac{F_{out}}{V}+\frac{1}{x}\times\frac{dx}{dt}+\frac{1}{V}\times\frac{dV}{dt}\right)X_{macro,i} \tag{6}$$

此外，对任何操作形式的生物反应器

$$D=\frac{F_{out}}{V}+\frac{1}{V}\times\frac{dV}{dt} \tag{7}$$

方程式（7）与生物质总浓度的质量平衡方程式（3.20）一起可得到方程式（3.16）。

为了推导方程式（3.18），我们可用方程式（3.17），其意指：

$$\sum_{i=1}^{Q}\frac{dX_{macro,i}}{dt}=\sum_{i=1}^{Q}r_{macro,i}-\mu\sum_{i=1}^{Q}X_{macro,i}=0 \tag{8}$$

由此可直接得到方程式（3.18）。

对于胞内代谢物，使用与生物质组分相同的浓度单位不太方便。这些代谢物溶于胞液中，因此，以单位细胞液体体积的摩尔表示其浓度更为恰当。选择这个单位，还可直接对胞内代谢物浓度与酶亲和性进行比较，后者常以它们的 K_m 值来量化，其单位为 $mol\cdot L^{-1}$。对于用某一单位表示的浓度，如果生物质密度（在 1g 细胞/ml 细胞范围内）及水的含量（在 0.67ml 水/ml 细胞范围内）已知，则很容易将该单位转换成另一单位。尽管胞内代谢物使用了不同的浓度单位，生物质仍是基准，并且胞内代谢物的质量平衡方程也用生物质组分的相同形式来表示：

$$\frac{dc_{met,i}}{dt}=r_{met,i}-\mu c_{met,i} \tag{3.19}$$

式中，$c_{met,i}$ 为第 i 个胞内代谢物的浓度。重要的是对两种浓度单位做出区别：它是用 mol/反应器液体体积还是用 mol/细胞液体体积表示。若浓度的单位采用前者，那么质量平衡方程式将完全不同。

式（3.13）、式（3.15）、式（3.16）及式（3.19）代表了细胞化学计量学中 4 种不同类

型物质的质量平衡。此外，总的生物质平衡也很重要，其方程如下：

$$\frac{\mathrm{d}x}{\mathrm{d}t}=(\mu-D)x \tag{3.20}$$

从这个方程中容易看出在稳态时的比生长速率等于稀释率。因此，在连续培养中通过改变稀释速率（或加料速率），就可得到不同的比生长速率。

式（3.13）、式（3.15）、式（3.16）及式（3.19）的质量平衡形成了细胞培养过程以任何方式定量处理的基础，其范围包括从比速率（或体积速率）的计算到生物过程的设计与模拟。对于生物过程设计及模拟，必须给出速率向量 **v** 中各个反应速率的动力学表达式，即提供反应速率与系统变量之间的函数关系。将化学计量反应式与反应速率动力学方程结合就构成了一个动力学模型。其可用于过程模拟，例如确定在不同操作条件下，系统如何工作。在一些生化工程教科书［如 Bailey and Ollis（1986）或 Nielsen and Villadsen（1994）］中已广泛讨论了利用简单的动力学模型（也称为非结构模型）或高级的结构模型进行培养过程的设计及模拟，为此本文不作进一步讨论。下面讨论如何利用实验数据确定代谢物及生物质组分的比速率等方面的问题。

表 3.2 列出了不同的方程式，用它可以计算在不同的操作条件下生物反应器中底物吸收、代谢产物形成及生物质组分（包括生物质组分和胞内代谢物）净合成的比速率。在所有情况下，均可看到生物质浓度是一个重要的变量。若得不到可靠的生物质浓度数据，则应采用体积速率而不是比速率。然而体积速率的缺点是不能直接比较不同实验中的数据。例如在一个实验中，生物质的生长速率为 2.0g(干重)$\cdot$L$^{-1}\cdot$h^{-1}，而在另一实验中为 1.0g(干重)$\cdot$L$^{-1}\cdot$h^{-1}，尽管比生长速率可以相同为 0.2h^{-1}，但第一个实验中生物质浓度为 10g（干重）$\cdot$L^{-1}，而第二个实验中为 5g（干重）$\cdot$L^{-1}。

表 3.2　用实验数据计算比速率所使用的方程

生物反应器	底　物	代谢产物	胞内物质
分批式	$r_s=-\frac{1}{x}\times\frac{\mathrm{d}c_s}{\mathrm{d}t}$	$r_p=\frac{1}{x}\times\frac{\mathrm{d}c_p}{\mathrm{d}t}$	$r_{macro}=\frac{\mathrm{d}X_{macro}}{\mathrm{d}t}+\mu X_{macro}$
连续式			
动态条件	$r_s=\frac{1}{x}\left[D(c_s^f-c_s)-\frac{\mathrm{d}c_s}{\mathrm{d}t}\right]$	$r_p=\frac{1}{x}\left(Dc_p+\frac{\mathrm{d}c_p}{\mathrm{d}t}\right)$	$r_{macro}=\frac{\mathrm{d}X_{macro}}{\mathrm{d}t}+\mu X_{macro}$
稳态	$r_s=\frac{1}{x}D(c_s^f-c_s)$	$r_p=\frac{1}{x}Dc_p$	$r_{macro}=\mu X_{macro}$
流加式	$r_s=\frac{1}{x}\left[D(c_s^f-c_s)-\frac{\mathrm{d}c_s}{\mathrm{d}t}\right]$	$r_p=\frac{1}{x}\left(Dc_p^f+\frac{\mathrm{d}c_p}{\mathrm{d}t}\right)$	$r_{macro}=\frac{\mathrm{d}X_{macro}}{\mathrm{d}t}+\mu X_{macro}$

注：对于胞内物质，仅列出生物质组分的表达式，它与胞内代谢物的表达式相似。

从表 3.2 还可看出，除了处于稳态的连续式生物反应器外，确定其它条件下的比速率需要计算浓度对时间的导数。根据浓度测量曲线切线的斜率即可得到对时间的导数。然而应该认识到由于实验数据通常稀疏并且有噪声，因此，通过这种方法对时间求导数难以得到好的估值。由此可清楚显示稳态连续培养的优点，它能精确估算出比速率。然而，有关细胞生理的许多信息是从分批培养及处于动态条件下的连续培养中获得的，因此通过应用稳健的步骤从这类实验中获取有关比速率的信息是非常重要的。

另一种方法是将数据用函数表示，例如用多项式样条函数表示，以便用所拟合的函数计算导数和比速率。但这种方法也能使比速率产生大的波动，因为难以找出合适的函数形式来表示培养过程实验数据（应注意到的是，为了获得比速率，必须推导出目标化合物浓度及生

物质浓度的两种函数式)。由于大多数细胞反应过程可用指数函数表示，所以用多项式样条函数式来表达是不太适当的。有一种较好的方法，尤其适用于分析分批式培养的数据，即用简单的模型如 Monod 模型❶ 进行参数拟合，然后直接从模型计算比速率。由于像 Monod 模型这样的简单模型，其本质属经验性质的，因此原则上这种方法与寻求一种合适的函数形式表示数据是相同的。但由于这些模型通常很适于处理分批培养的数据，其结果还是令人满意的。

前面介绍的实验数据的函数表示法（或完全经验性的或用简单的动力学模型）适用于可获得足够多数据的场合。然而由于胞内物质只是零星测定，因而就很难正确估算其时间导数。一般来说，对胞内代谢物可假设为拟稳态（见 8.1 节）。另外，在分批培养的指数生长期，所谓的平衡生长通常占优势。这意味着生物质的胞内组分不发生变化，即生物质组分的浓度处于稳定状态，因此，只是通过测量一个或一些大分子组分及比生长速率好的估计值，就可确定向量 $\boldsymbol{r}_{\mathrm{macro}}$的各组成元素。

3.4　产率系数与线性速率方程

正如本章引言中所提到的，代谢模型是细胞生理定量分析的基础。但通常是这样的情况：人们并不是对胞内反应的所有细节感兴趣，而是想对总的代谢通量分布作更宏观的评估，例如葡萄糖中的碳有多少用于生成目标代谢物等。总的通量分布通常以产率系数表示，它指相对于某一参照物（通常为碳源或生物质）的总通量。因此产率系数是无因次的，其形式为：每单位质量参照物生成单位质量代谢物。例如，消耗每摩尔葡萄糖生成的赖氨酸的物质的量（摩尔）。然而在不同的情况下也可采用其它参照物，因而消耗每摩尔氧生成 CO_2 的物质的量［称为呼吸商（RQ)］常用于表示好氧培养的特征。遗憾的是，在文献中出现了几种不同的产率系数表示法。在此将采用 Nielsen 与 Villadsen（1994）的命名法［Roels (1983) 文献介绍]。产率系数以双下标表示 Y_{ij}，指每消耗（或形成）单位质量 i 物质所形成（或消耗）j 物质的量。以第 i 个底物为参照，产率系数可表示如下：

$$Y_{\mathrm{s}_i,\mathrm{s}_j} = \frac{r_{\mathrm{s},j}}{r_{\mathrm{s},i}};\quad j = 1,\cdots,N \tag{3.21}$$

$$Y_{\mathrm{s}_i,\mathrm{p}_j} = \frac{r_{\mathrm{p},j}}{r_{\mathrm{s},i}};\quad j = 1,\cdots,M \tag{3.22}$$

$$Y_{\mathrm{s}_i x} = \frac{\mu}{r_{\mathrm{s},i}} \tag{3.23}$$

很明显

$$Y_{ij} = \frac{1}{Y_{ji}} \tag{3.24}$$

产率系数对评估实验数据极有价值，其通常是从原始发酵数据中提取出的首批定量数据。产率系数的重要性首先在于它是向本征速率中引入某些有用关系的工具。例如某一产率系数确定为或假设为常数，这就立刻暗示着在两个速率之间存在着一定关系。这种关系也许完全是

---

❶ 在 Monod 模型中，比生长速率可由 $\mu = \frac{\mu_{\max} c_{\mathrm{s}}}{c_{\mathrm{s}} + K_{\mathrm{s}}}$ 表示，式中，$\mu_{\max}$ 为最大比生长速率；K_{s} 为 Monod 常数；c_{s} 为限制型基质浓度。该模型假定基于限制型基质的生物质得率为常数（见 3.4 节），因此，基质比消耗速率可由 $r_{\mathrm{s}} = Y_{x\mathrm{s}}\mu$ 表示（也见 3.4 节）。

经验性的或可从其它基本的生化及生理关系中推导出，讨论如下：

由 Monod（1942）引入的对细胞生长的经典描述中，产率系数 Y_{sx}被视为常数，所有的细胞反应汇集为一个底物转变为生物量的总生长反应。1959 年，Herbert（1959）研究表明了生物质对底物的得率并不是常数。为了说明这一点，他引入了内源代谢的概念，并指出总的底物消耗除用于生物质合成之外，有一部分参与了内源代谢。同年，Luedeking 与 Piret（1959a，b）发现在非生长条件下，乳酸菌能产乳酸，这与细胞的内源代谢相一致。他们的结果表明了在乳酸的比生成速率与比生长速率之间存在着线性关系：

$$r_p = a\mu + b \tag{3.25}$$

Pirt（1965）在底物比吸收速率与比生成速率之间引入了相似的线性关系，他建议用维持这个词，此词现在是最常用的用以描述内源代谢的一个词。Pirt 所描述的线性关系如下：

$$r_s = Y_{xs}^{true}\mu + m_s \tag{3.26}$$

式中，Y_{xs}^{true}指真实生长得率系数；m_s 为维持系数。引入这些线性关系后，很明显，得率系数不再是常数，因此生物质对底物的得率变为：

$$Y_{sx} = \frac{\mu}{Y_{xs}^{true}\mu + m_s} \tag{3.27}$$

式（3.27）表明在低比生长速率的条件下，有越来越多的底物用于满足细胞的维持需要，此时实际得率 Y_{sx}可小于真实生长得率。对于高的比生长速率，产率系数接近 Y_{xs}^{true}的倒数，即在快速生长时由于大多数底物用于生长，实际生长得率系数接近于真实生长得率。

根据经验得出的线性关系对生长数据的关联很有用，尤其是对那些从稳态连续培养中所得的数据。对于大部分重要的比速率，利用这些速率可推导出与方程式（3.26）相似的线性关系式。图 3.3 可说明这一点，图中绘制了葡萄糖的吸收率、CO_2 比生成速率及氧比吸收率与处于稳态的丝状真菌产黄青霉（*Penicillium chrysogenum*）连续培养的比生长速率的函数关系。类似的线性关系也可从文献中找到，这种线性产率关系的异常强健及普遍适应性表明它们都来自于一个可能的根本的基础。一个可能性是在 ATP 的连续供给与消耗之间的平衡，这是由于所有细胞中 ATP 的产生与耗尽的紧密耦合。在此假设下，产能底物的作用就是产生足够多的 ATP 以驱动细胞中的生物合成和聚合反应，此外还有不同的维持过程。这种耦合由式（2.27）所示的线性关系表示：

$$r_{ATP} = Y_{xATP}\mu + m_{ATP} \tag{3.28}$$

式（3.28）是 Pirt（1965）所述线性关联的一个类似形式。如 2.6 节所讨论的，方程式（3.28）说明生成的 ATP 与在生长和维持过程中所消耗的 ATP 严格平衡。此外，如果产能底物的 ATP 得率为恒定，即 r_{ATP} 与 r_s 成正比，那么很明显，从式（3.28）可直接推导出式（3.26）的线性关系。还需注意的是：式（3.28）中的 Y_{xATP}实际上是真

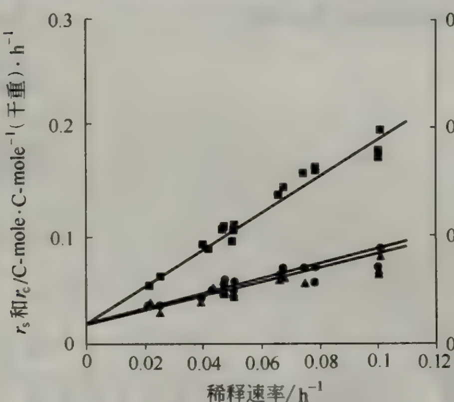


图 3.3 在 *P. chrysogenum* 葡萄糖限制性连续培养中的相关速率函数关系

■ 葡萄糖比吸收速率 r_s；▲ 氧气比吸收速率 r_o；● CO_2 比生成速率 r_c

比生长速率等同于稀释速率。这些速率是以单位浓度细胞为基准而表示的各个组分变化速率。给生物反应器提供的为限制性培养基，包括葡萄糖、铵、无机盐和苯氧基醋酸盐。数据来自于 Nielsen（1997）

实的 ATP 得率系数，但通常表示时不加上标“true”。

平衡 ATP 产生与消耗这个概念可扩大到其它辅助因子，如 NADH 及 NADPH，由此就可能导出三种不同条件下的线性速率方程（Nielsen and Villadsen，1994）：（1）厌氧生长，ATP 由底物水平磷酸化产生；（2）无代谢产物形成的好氧生长；（3）有代谢产物形成的好氧生长。现用下列例子（例 3.3 及例 3.4）说明前两种情况。

【例 3.3】 产黄青霉的代谢模型

对于无代谢产物形成的需氧过程，为了说明其线性速率方程的推导过程，现使用由 Nielsen（1997）提出的丝状真菌产黄青霉的简单代谢模型。其化学计量模型概括了总的细胞代谢反应，对 ATP、NADH 及 NADPH 作拟稳态假设后，就可推导出线性速率方程，其中葡萄糖、氧的比吸收速率及 CO_2 比形成速率可用比生长速率的形式来表示。通过与实验数据进行比较就可求出这些线性速率式中的参数，进而可获得关键的能量参数信息。在分析过程中，略去了代谢产物的形成（包括初级代谢产物，如葡萄糖酸及与青霉素生物合成有关的一些代谢物），这是因为流向这些产物的碳的通量比流向生物质及 CO_2 的通量小很多。

用于合成产黄青霉细胞组分的总化学计量反应式可概括为（Nielsen，1997）：

$$\underset{\text{(生物质)}}{\text{biomass}} + 0.139CO_2 + 0.458NADH - 1.139CH_2O - 0.20NH_3 - 0.004H_2SO_4$$
$$- 0.01H_3PO_4 - Y_{xATP}ATP - 0.243NADH = 0 \tag{1}$$

当底物为葡萄糖、无机盐，氨为 N 源，硫酸盐为 S 源，磷酸盐为 P 源时，对于含有表 2.8 中组分的细胞来说，该化学计量式成立。该式以 C-mol 为基础，即葡萄糖用 CH_2O 表示，并且根据大分子组分计算出的生物质元素组成为 $CH_{1.81}O_{0.58}N_{0.20}S_{0.004}P_{0.010}$（Nielsen，1997），这与文献报道的实验测定的组分非常吻合（见表 4.1）。由于 ADP、NAD^+ 及 $NADP^+$ 为耦联的辅助因子（见 3.1 节的讨论），在化学计量式中就没有包括它们。用于生物质合成所需的 ATP 及 NADPH 由分解代谢途径提供，在生物合成反应中过量生成的 NADH 与在分解代谢途径中形成的 NADH 一起经电子传递链将电子转移给氧而被重新氧化。

反应式（2）～反应（4）概括了分解代谢途径总的化学计量式。反应（2）表明 NADPH 由葡萄糖完全被氧化生成 CO_2 的磷酸戊糖途径产生；反应（3）是将 EMP 途径及 TCA 循环综合后的总化学计量式。最后，反应（4）是氧化磷酸化的总化学计量式。在上述化学计量式中，没考虑细胞中的内部结构，即不区分细胞质的和线粒体的 NADH，并且将 TCA 循环中形成的 $FADH_2$ 与 NADH 汇集在一起，因此反应（4）中的 P/O 比是氧化磷酸化的总的（或操作）P/O 比。

$$CO_2 + 2NADH - CH_2O = 0 \tag{2}$$

$$CO_2 + 2NADH + 0.677ATP - CH_2O = 0 \tag{3}$$

$$P/OATP - 0.5O_2 - NADH = 0 \tag{4}$$

最后用于维持所消耗的 ATP 简单地包含在一个利用 ATP 的反应中：

$$-ATP = 0 \tag{5}$$

需注意：上述化学计量反应式是以 C-mol 为基础的，所以源于生物化学的化学计量系数［例如在 EMP 途径中，1mol 葡萄糖生成 2mol ATP］应除以 6，因为 1mol 葡萄糖含 6 C-mol。

前面的化学计量式是以方程式（3.3）的形式写出的，但很容易将之转变为方程式（3.4）那样的更紧凑的矩阵表达式：

$$\begin{pmatrix} -1.139 & 0 \\ -1 & 0 \\ -1 & 0 \\ 0 & -0.5 \\ 0 & 0 \end{pmatrix} \begin{pmatrix} S_{glc} \\ S_{O_2} \end{pmatrix} + \begin{pmatrix} 0.139 \\ 1 \\ 1 \\ 0 \\ 0 \end{pmatrix} P_{CO_2} + \begin{pmatrix} 1 \\ 0 \\ 0 \\ 0 \\ 0 \end{pmatrix} X + \begin{pmatrix} -Y_{xATP} & 0.458 & 0.243 \\ 0 & 0 & 2 \\ 0.667 & 2 & 0 \\ P/O & -1 & 0 \\ -1 & 0 & 0 \end{pmatrix} \begin{pmatrix} X_{ATP} \\ X_{NADH} \\ X_{NADPH} \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} 0 \\ 0 \\ 0 \\ 0 \\ 0 \end{pmatrix} \tag{6}$$

式中，X 代表生物质。若在反应(1)～反应(5)中以速率向量 $\mathbf{v}$ 的形式引入正反应速率：

$$\mathbf{v} = \begin{pmatrix} \mu \\ v_{PP} \\ v_{EMP} \\ v_{OP} \\ m_{ATP} \end{pmatrix} \tag{7}$$

那么，三个辅助因子 ATP、NADH 及 NADPH 的生成与消耗之间就可以获得平衡，与方程（3.28）类似，可列出下面三个方程：

$$-Y_{xATP}\mu + 0.667v_{EMP} + P/O\,v_{OP} - m_{ATP} = 0 \tag{8}$$

$$0.458\mu + 2v_{EMP} - v_{OP} = 0 \tag{9}$$

$$-0.243\mu + 2v_{PP} = 0 \tag{10}$$

注意到这些平衡相应于上述三种辅助因子的净比生成速率为零。因此，用方程式（3.12）也可推导出这些平衡方程式：

$$\mathbf{r}_{met} = \begin{pmatrix} r_{ATP} \\ r_{NADH} \\ r_{NADPH} \end{pmatrix} = G^T v = \begin{pmatrix} -Y_{xATP} & 0 & 0.677 & P/O & -1 \\ 0.458 & 0 & 2 & -1 & 0 \\ -0.243 & 2 & 0 & 0 & 0 \end{pmatrix} \begin{pmatrix} \mu \\ v_{PP} \\ v_{EMP} \\ v_{OP} \\ m_{ATP} \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} 0 \\ 0 \\ 0 \end{pmatrix} \tag{11}$$

除了三个稳态平衡方程式［方程式（8）～方程式（10）］之外，以 5 个反应速率［方程式（7）］的形式，还有葡萄糖和氧的比吸收速率以及 CO_2 比生产速率之间的关系。这些关系可通过方程式（3.5）和方程式（3.6）表示，或用方程式（3.9）及方程式（3.10）的矩阵形式表示：

$$\begin{pmatrix} r_{glc} \\ r_{O_2} \end{pmatrix} = -\begin{pmatrix} -1.139 & -1 & -1 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & -0.5 & 0 \end{pmatrix} \begin{pmatrix} \mu \\ v_{PP} \\ v_{EMP} \\ v_{OP} \\ v_{ATP} \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} 1.139\mu + v_{PP} + v_{EMP} \\ 0.5v_{OP} \end{pmatrix} \tag{12}$$

$$r_{CO_2} = (0.139 \quad 1 \quad 1 \quad 0 \quad 0) \begin{pmatrix} \mu \\ v_{PP} \\ v_{EMP} \\ v_{OP} \\ m_{ATP} \end{pmatrix} = 0.139\mu + v_{PP} + v_{EMP} \tag{13}$$

消除方程式（11）~方程式(13）中的三个速率 v_{EMP}、v_{PP}、v_{OP}，可推导出线性速率方程式(14)~方程式（16）：

$$r_{glc} = (a + 0.261)\mu + b = Y_{xs}^{true}\mu + m_s \tag{14}$$

$$r_{CO_2} = (a + 0.261)\mu + b = Y_{xc}^{true}\mu + m_c \tag{15}$$

$$r_{O_2} = (a + 0.261)\mu + b = Y_{xo}^{true}\mu + m_c \tag{16}$$

根据方程式（17）和方程式（18）可得到两个共同参数 a 与 b，它们是能量参数 Y_{xATP}、m_{ATP}及 P/O 比的函数：

$$a = \frac{Y_{xATP} - 0.458P/O}{0.667 + 2P/O} \tag{17}$$

$$b = \frac{m_{ATP}}{0.667 + 2P/O} \tag{18}$$

方程式（14）可视为与 Pirt 推荐的线性速率方程式（3.26）基本相同，差别在于前者是根据细胞基本的能量参数得到得率关系式。这对于上述线性关系式中的所有参数来说都是对的，因为它们是经 ATP、NADH 及 NADPH 平衡而耦合的。可以看出，若不是它们实际上通过这些平衡来耦合，这三个得率系数没有任何价值。此外，这些维持系数是相同的。这是由于选择以每 C-mol 的生物质每小时为基准的 C-mol 作为比速率的单位。若比速率采用其它单位，维持系数的值将会不同，但它们是有关系的。这些参数的耦合，表明系统仅有两个自由度［等价于方程式（14）~方程式（16）中定义的参数 a 与 b］，因此实际上只需测定一个产率系数和一个维持系数即可，其它参数可利用三个方程式（14）~方程式（16）算出。

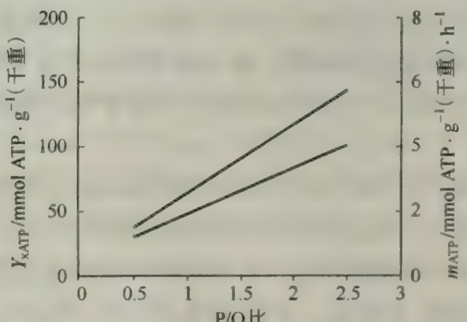


图 3.4 *P. chrysogenum* 的能量参数 Y_{xATP}和 m_{ATP}与操作 P/O 比之间的函数关系

导出的线性速率方程对关联实验数据当然很有用，但是也可用于关键的能量参数 Y_{xATP}、m_{ATP}及操作 P/O 比的求取。因此，如果求出方程式（14）~方程式（16）的真实产率系数和维持系数（通过葡萄糖、氧及 CO_2 的速率实验数据对比生长速率进行线性回归），就可确定 a、b 的值，进而利用 a、b 的值及方程式（17）和方程式（18），就可得到 3 个能量参数。根据图 3.3 的数据可确定 a 与 b 的值分别为 0.436 C-mol·C-mol^{-1}（干重）及

0.018 C-mol·C-mol^{-1}·h^{-1}（Nielsen，1997）。利用 3 个产率系数（相对标准误差为 2.7%）可得到 a 是一个平均值。仅用两个方程不可能求出所有三个能量参数 Y_{xATP}、m_{ATP}及操作 P/O 比，但如果其中一个参数已知，就可计算出另外两个。图 3.4 描绘了 Y_{xATP}和 m_{ATP}与操作 P/O 比之间的函数关系。产黄青霉的准确的操作 P/O 比值还不知道，但可能在 1.0～2.0 的范围内（Nielsen，1997）。若 P/O 比为 1.5，Y_{xATP}约为 2.29mmol ATP·（C-mol 生物质）$^{-1}$［或 80mmol·g^{-1}（干重），摩尔质量为 26.33g·(C-mol)$^{-1}$，灰分 8%］。这与所报道的酿酒酵母的值在同一范围内（见表 2.6）。

【例 3.4】　酿酒酵母的能学

厌氧生长时，大多数细胞通过底物水平磷酸化产生 ATP 同时将能源转化为一种或多种代谢物。在复合培养基中生长时，生物合成反应中没有（或很少）NADH 生成及没有（或很小）NADPH 消耗，因为从充足供给的培养基组分中可得到这些物质。因此，能源的氧化还原水平被保存于分解代谢途径所形成的代谢物中，即在糖酵解中所形成的所有 NADH 均消耗于丙酮酸转化成不同代谢物的反应中。例 3.1 的大肠杆菌混合酸发酵就说明了这一点，这在乳酸同型发酵中也是一个重要考虑，该过程中丙酮酸通过乳酸脱氢酶转化成乳酸。在上述反应过程中，正是仅有 ATP 耦合着分解代谢与合成代谢，因此有可能单从 ATP 平衡推导出 Leudeking 和 Piret 的线性速率方程式（3.25)［还可参照 Nielsen 和 Villadsen（1994)］。

在基本培养基上生长时，伴随着生物合成反应的进行，有大量 NADH 的产生及大量 NADPH 的消耗（见 2.4 节）。这些辅助因子必须在供能反应中再生，结果在分解代谢与合成代谢之间产生紧密的耦合。在酿酒酵母厌氧生长过程中，这种耦合导致除了初级代谢产物外（在这种情况下当然是乙醇）甘油的生成。甘油是通过还原反应生成的，其包括由将磷酸二羟基丙酮催化转化成 3-磷酸甘油，进而由 3-磷酸甘油脱氢酶催化去磷酸而生成甘油［见反应（2.6)］。在第一个反应中，NADH 被氧化为 NAD^+，因此葡萄糖至甘油的总反应将导致 NADH 的消耗。由于在 3-磷酸甘油的去磷酸反应中没有 ATP 再生，所以葡萄糖至甘油的总转化过程是一个消耗 ATP 的过程。

酿酒酵母的厌氧生理学已由 Schulze（1995）进行了广泛研究，在本例中，我们将用一个简单的代谢模型对其部分结果进行分析。通过酿酒酵母大分子组分的分析，Schulze 计算了与生物质合成相关的 NADH 及 NADPH 的化学计量系数。利用他的数据可得到细胞生长的总化学计量反应式：

$$CH_{1.82}O_{0.58}N_{0.16} + 0.105CO_2 + 0.355NADH - 1.105CH_2O - 0.16NH_3 - Y_{xATP}ATP - 0.231NADPH = 0 \quad (1)$$

元素组分取自表 4.1，底物为葡萄糖和氨。硫酸盐和磷酸盐包含于灰分中，为 8%。如同例 3.3，化学计量反应以 C-mol 为基础，即葡萄糖表示为 CH_2O，假定生物合成所需要的 NADPH 仅在 PP 途径中生成，因此与例 3.3 一样可得下式：

$$CO_2 + 2NADPH - CH_2O = 0 \quad (2)$$

用于生物合成的 ATP 由葡萄糖生成乙醇的反应提供，其计量反应式为：

$$0.5CO_2 + CH_3O_{0.5} + 0.5ATP - 1.5CH_2O = 0 \quad (3)$$

如前所述，与生物合成相关而生成的 NADH 用于葡萄糖生成甘油的反应。因为 1mol 葡萄糖转化为甘油时，2mol NADH 被氧化，葡萄糖生成 1,6-二磷酸果糖需 2mol ATP（生成甘油过程中无 ATP 再生），所以生成甘油的总化学计量反应式为：

$$CH_{8/3}O - 0.333NADH - 0.333ATP - CH_2O = 0 \quad (4)$$

最后，还要包括用于维持反应的 ATP 的消耗，这同例 3.3 一样，可表示为：

$$-ATP = 0 \quad (5)$$

遵从前面的步骤，可将上述 5 个反应的正反速率以速率向量 v 表示：

$$\mathbf{v} = \begin{pmatrix} \mu \\ v_{PP} \\ r_{EtOH} \\ r_{gly} \\ m_{ATP} \end{pmatrix} \quad (6)$$

用所确定的化学计量系数与胞内反应速率，对三个辅助因子建立平衡方程。NADPH 的平衡给出了 v_{PP}和比生长速率之间的直接耦合关系：

$$-0.231\mu + 2v_{PP} = 0 \quad (7)$$

同样，NADH 的平衡使比生长速率与甘油比生成速率产生如下关系：

$$0.355\mu - 0.333r_{gly} = 0 \quad (8)$$

方程式（8）相当于甘油产率为 1.066 C-mol 甘油·(C-mol 生物质)$^{-1}$。在 Schulze (1995) 的分析中，他提出的值为 10.01mmol 甘油·g^{-1}（干重），考虑到前面给出的生物质元素组成及 8%的灰分，该值相当于 0.827 C-mol 甘油·（C-mol 生物质）$^{-1}$，这个值远低于通过代谢模型计算所得到的值。此外，实验观察到琥珀酸的分泌，其伴随着更多的 NADH 的形成(1mol 琥珀酸生成 5mol NADH)。因此琥珀酸的生成迫使形成更多的甘油，以便容纳所增产的 NADH。琥珀酸对生物质的得率为 0.25 mmol 琥珀酸·g^{-1}（干重），这相当于形成 1.25 mmol 甘油·g^{-1}（干重）。因此，所生成的甘油中仅有 8.76 mmol·g^{-1}（干重）或 0.724C-mol 甘油·（C-mol 生物质）$^{-1}$是由于生物合成而产生的，它使得偏离自代谢模型更大。这或是由于在方程式（1）中与生物合成相关的 NADH 生产可能过大，或是由于存在着转氢酶的一些活动使得 NADH 转化为 NADPH。

由 ATP 平衡可得：

$$0.5\, r_{EtOH} - 0.333r_{gly} = Y_{xATP}\mu + m_{ATP} \quad (9)$$

由方程式（8）将甘油形成速率带入式（9）即：

$$r_{EtOH} = 2(Y_{xATP} + 0.355)\mu + 2m_{ATP} \quad (10)$$

这相当于应用到乙醇生成的 Luedeking-Piret 模型。Schulze 的分析发现，乙醇对生物质的真实得率系数为 85.05mmol·g^{-1}（干重），其相当于 4.69C-mol 乙醇·（C-mol 生物质）$^{-1}$。因此，Y_{xATP}为 1.95mol ATP·（C-mol 生物质）$^{-1}$或大约 71mmol ATP·g^{-1}（干重）。若方程式（9）直接用于计算 ATP 生产，而 Y_{xATP}是通过 r_{ATP}对 μ 作图来确定，那么就得到一个稍高的值，即 73mmol ATP·g^{-1}（干重）（schulze，1995）。这种差别是由于代谢模型中甘油生成的过高估计，这一点前面已讨论过。

对于葡萄糖吸收速率

$$r_s = 1.105\mu + 1.5r_{EtOH} + r_{gly} \quad (11)$$

将方程式（8）和方程式（10）代入方程式（11）可得到方程式（12）：

$$r_s = \left[1.105 + 3.0(Y_{xATP} + 0.355) + \frac{0.355}{0.333}\right]\mu + 2m_{ATP} \quad (12)$$

通过此例可再次看到线性速率方程式（3.26）可以推导，而且真实得率系数 Y_{xs}^{true} 是通过细胞合成的关键参数（即消耗的 ATP、NADPH 与生成的 NADH）所确定的。此外还可推导出类似于方程式（12）的生成 CO_2 的线性速率方程。

参 考 文 献

Bailey, J.E. & Ollis. D. F. (1986) .*Biochemical Engineering Fundamentals*, 2nd ed. New York: MacGraw-Hill.

Herbert, D. (1959). Some principles of continuous culture. *Recent Progress in Microbiology* **7**, 381[1]-396.

Ingraham, J. L., Maaloe, O.& Neidhardt. F. C. (1983).*Growth of the Bacterial Cell*. Sunderland: Sinnauer Associated.

Luedeking, R.& Piret, E. L. (1959a). A kinetic study of the lactic acid fermentation. Batch process at controlled pH. *Journal of Biochemical and Microbiological Technology and Engineering* **1**, 393-412.

Luedeking, R. & Piret, E. L. (1959b) . Transient and steady state in continuous fermentation. Theory and experiment. *Journal of Biochemical and Microbiological Technology and Engineering* **1**, 431-459.

Monod, J. (1942). *Recherches sur la Croissance des Cultures Bacteriennes*. Paris: Hermann et Cie.

Nielsen, J. (1997). *Physiological Engineering Aspects of* Penicillium chrysogenum. Singapore: World Scientific Publishing Co.

Nielsen, J. & Villadsen. J. (1993). Bioreactors: Description and modelling. In *Biotechnology*, 2nd ed., vol.3. Chapter 5 pp. 77-104. Edited by H.-J.Rehm & G. Reed (volume editor G. Stephanopoulos). VCR Verlag.

Nielsen, J. & Villadsen. J. (1994). *Bioreaction Engineering Principles*. New York: Plenum Press.

Pirt. S. J. (1965) .The maintenance energy of bacteria in growing cultures. *Proceedings of The Royal Society* London. Series B **163**, 224-231.

Roels, J. A. (1983). *Energetics and Kinetics in Biotechnology*. Amsterdam: Elsevier Biomedical Press.

Schulze, U. (1995). Anaerobic physiology of *Saccharomyces cerevisiae*. Ph.D.Thesis, Technical University of Denmark.

Sonnleitner. B. & Fiechter. A. (1988) High performance bioreactors: A new generation *Analytica Chimica Acta* **213**, 199-205.

第 4 章　物质平衡与数据一致性

代谢的定量分析需要用实验数据对很多参数尤其是代谢通量、通量分布以及通量控制的度量（见第 11 章）进行确定。因而，这些计算将举例说明原始发酵数据信息内容升级的方法与程序。虽然本书的重点是代谢及其控制，但只要可得到定量测定，那么信息内容升级的基本哲理可适用于整个生命科学。

由于信息升级的方法是由数据驱动的，因此保证所用数据的可靠性是极端重要的。为此，可采用常用的随机误差最小法，例如，重复实验、多种传感器、仔细校正等。另外一个考虑（是本章之主题）是引入数据冗余以验证实际的测量数据和对这些测量进行分析的更广泛的机理框架。例如，进行代谢分析时，通量计算是基于底物吸收及产物形成的比速率的测量，它代表进出细胞的通量。在进行任何此类派生的计算之前，进一步证实数据的一致性是很重要的，例如，碳收支完全平衡。

当使用多种检测器测定同一变量或由此所得的测量必须满足某些限制条件（例如物质收支完全平衡）时，就可引入数据冗余这个概念。显然，冗余度越大，数据及其衍生参数的可信度就越高。此外，还可用冗余数据系统地检测过失测量误差的来源，或识别该框架体系（如模型等）的一个特定部分是否最可能造成数据的不一致性。在这一章中，我们将在通量、代谢及质量平衡的范围内证实这些思想。因此，用于定量分析的实验数据必须：

● 完整　这并不意味着必须测量所有的底物及代谢产物，只需量化那些足量存在的物质以便允许验证碳、氮（有些情况下还包括硫和磷）平衡。这就要求必须使用成分确定的基本培养基，并且本质上在系统的代谢研究中要排除天然培养基。

● 尽可能无噪声　如 3.3 节所讨论的，比速率是由浓度分布的测量推导而来的，因此，如果这些数据有噪声，将使速率的计算很困难。因此，细胞代谢定量分析的一个重要方面是开发精确可靠的分析技术，这通常是由计算机控制的、高性能生物反应器在线监测最重要的培养变量。

评估实验数据的一致性有两种方法，第一种是基于非常简单的代谢模型，即黑箱模型。该模型将所有细胞反应汇集为一个单个反应，用以描述整个细胞生物质生长，该方法本质上是由验证元素平衡所构成。由于只需要底物、代谢产物和生物质的元素组成信息以及进出细胞的通量，所以该法使用起来相当容易。第二种方法重视从底物到生物质及代谢产物总转化过程的更多生物化学细节。因而，它在数学上更复杂，当然，它也比黑箱模型对实际自由度提供了更真实的描述。我们开发这种代谢模型以与代谢通量分析（在 8.3 节）的讨论相联系。因为本章的重点主要是数据一致性分析方法论的开发，因此，消除了由于代谢复杂性所产生的不必要的麻烦而使用黑箱模型。

4.1　黑箱模型

在黑箱模型中，细胞生物质是与环境交换着物质的黑箱（如图 4.1 所示），它将许多细胞反应汇集为单一的生物质生长反应。进出黑箱的通量以比速率表示（单位时间克或摩尔物质每克或每摩尔生物质），它们是底物比吸收速率（$\mathbf{r}_s$ 中的元素）和产物比形成速率（$\mathbf{r}_p$ 中

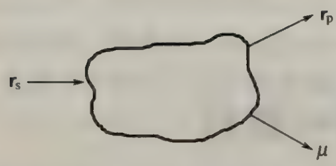


图 4.1 黑箱模型示意图
将细胞视为一个黑箱，所测的变量只是进出细胞的通量。进入细胞的底物通量为向量 $\mathbf{r}_s$ 中的元素，从细胞出来的代谢产物的通量是向量 $\mathbf{r}_p$ 中的元素。最初存在于底物中的某些物质在黑箱内以比速率 μ 形成新的生物质而积累

的元素)。此外，黑箱中还有生物质的积累，它以比速率 μ 作为一个通量来表示。由于所有的细胞反应被汇集为一个总反应，因此，在这个总反应中化学计量系数可由 3.4 节引入的得率系数表示，于是：

$$X + \sum_{i=1}^{M} Y_{xp_i} P_i - \sum_{i=1}^{N} Y_{xs_i} S_i = 0 \tag{4.1}$$

这里以生物质比生成速率作为参照。由于生物质的化学计量系数为 1，正反应速率由生物质比生长速率表示，它与方程式（4.1）得率系数一起，就完全表示了这个系统。用黑箱模型分析数据一致性时可采用下述四种方法之一：（1）方程式（4.1）中的一组得率系数及比生长速率；（2）相应于另一参照物（如底物之一）的一组得率系数以及该参照物的比形成/消耗速率；（3）所有底物、产物及生物质的一组比速率；（4）由生物质浓度与比速率乘积所得到的所有体积速率。所有这些变量均提供同样的信息。在下文中，我们既可用方程式（4.1）的得率系数也可用方程式（4.2）表示的总速率向量 $\mathbf{r}$ 的变量中的比速率：

$$\mathbf{r} = \begin{bmatrix} \mu \\ \mathbf{r}_p \\ -\mathbf{r}_s \end{bmatrix} = (\mu \quad r_{p,1} \quad \cdots \quad -r_{s,1} \quad \cdots)^T \tag{4.2}$$

【例 4.1】 简单的黑箱模型

考虑在基本培养基（如葡萄糖为碳源及能源，氨为氮源）中对酿酒酵母进行需氧培养。在需氧生长过程中，葡萄糖被完全氧化为 CO_2。但当糖酵解途径通量很高时，丙酮酸氧化中的瓶颈效应将导致乙醇的形成。因此，在高的糖酵解通量下，乙醇和 CO_2 均应视为代谢产物。最后，细胞代谢所生成的水也应作为总反应一个的产物。于是，这个系统的黑箱模型为：

$$X + Y_{xe}\underset{(乙醇)}{\text{ethand}} + Y_{xc}CO_2 + Y_{xw}H_2O - Y_{xs}\underset{(葡萄糖)}{\text{glucose}} - Y_{xo}O_2 - Y_{xN}NH_3 = 0 \tag{1}$$

用比速率向量可表示成：

$$\mathbf{r} = (\mu \quad r_e \quad r_c \quad r_w \quad -r_s \quad -r_o \quad -r_N) \tag{2}$$

显然方程式（1）中的化学计量（或得率）系数不是常数，因为比生长速率低时（相当于低的糖酵解通量），Y_{xe}为零，而比生长速率较高时，Y_{xe}将大于零。

4.2 元素平衡方程式

在黑箱模型中共有 $M+N+1$ 个变量，即：M 个代谢产物的得率系数，N 个底物得率系数，还有正反应速率 μ [见方程式（4.1)]，或方程式（4.2）中 $M+N+1$ 个比速率。因为在底物转变为代谢产物和生物质的反应中质量守恒，所以黑箱模型中的 $M+N+1$ 个速率并不是完全独立的，但必须满足一些限制条件。因此，进出此系统的元素必需平衡，例如，通过底物进入系统中的碳必须在代谢产物及生物质中得到回收。显然在黑箱中所考虑的每一个元素均产生一个限制条件。因此，碳平衡方程为：

$$1+\sum_{i=1}^{M}h_{p,i}Y_{xp_i}-\sum_{i=1}^{N}h_{s,i}Y_{xs_i}=0 \tag{4.3}$$

式中，$h_{s,i}$与$h_{p,i}$分别代表第i个底物及第i个代谢产物的碳含量（C-mol·mol^{-1}）。在此方程中，以碳为参照物，对生物质的元素组分进行标准化，如可以用$CH_aO_bN_c$的形式表示。生物质的元素组成取决于其大分子的含量因而也取决于生长条件及比生长速率［例如，在氮源受限制条件下的氮含量远低于在碳源受限制条件下的值（见表4.1）］。但是除某些极端情况外，当还不确切知道生物质组成时，使用一般的组成式$CH_{1.8}O_{0.5}N_{0.2}$是合理的。

用比速率也可表示方程式（4.3）的碳平衡式，用μ乘以方程式（4.3）并利用得率系数的定义就可得到：

$$\mu+\sum_{i=1}^{M}h_{p,i}r_{p,i}-\sum_{i=1}^{N}h_{s,i}r_{s,i}=0 \tag{4.4}$$

通常，相应于底物及代谢产物中的碳含量来对它们的元素组成进行标准化，例如葡萄糖用CH_2O表示。以每C-mol为基础，方程式（4.3）可写为：

$$1+\sum_{i=1}^{M}Y_{xp_i}-\sum_{i=1}^{N}Y_{xs_i}=0 \tag{4.5}$$

表4.1　几种微生物的生物质的元素组成

微生物	基本组分	灰分(质量分数)/%	条件
Candida utilis	$CH_{1.83}O_{0.46}N_{0.19}$	7.0	葡萄糖限制，$D=0.05h^{-1}$
	$CH_{1.87}O_{0.56}N_{0.20}$	7.0	葡萄糖限制，$D=0.45h^{-1}$
	$CH_{1.83}O_{0.54}N_{0.10}$	7.0	氨限制，$D=0.05$
	$CH_{1.87}O_{0.56}N_{0.20}$	7.0	氨限制，$D=0.45h^{-1}$
Klebsiella aerogenes	$CH_{1.75}O_{0.43}N_{0.22}$	3.6	甘油限制，$D=0.10h^{-1}$
	$CH_{1.73}O_{0.43}N_{0.24}$	3.6	甘油限制，$D=0.85h^{-1}$
	$CH_{1.75}O_{0.47}N_{0.17}$	3.6	氨限制，$D=0.10h^{-1}$
	$CH_{1.73}O_{0.43}N_{0.24}$	3.6	氨限制，$D=0.08h^{-1}$
Saccharomyces cerevisiae	$CH_{1.82}O_{0.58}N_{0.16}$	7.3	葡萄糖限制，$D=0.08h^{-1}$
	$CH_{1.78}O_{0.60}N_{0.19}$	9.7	葡萄糖限制，$D=0.255h^{-1}$
	$CH_{1.94}O_{0.52}N_{0.25}P_{0.025}$	5.5	无限制生长
Escherichia coli	$CH_{1.77}O_{0.49}N_{0.24}P_{0.017}$	5.5	无限制生长
	$CH_{1.83}O_{0.50}N_{0.22}P_{0.021}$	5.5	无限制生长
	$CH_{1.96}O_{0.55}N_{0.25}P_{0.022}$	5.5	无限制生长
	$CH_{1.93}O_{0.55}N_{0.25}P_{0.021}$	5.5	无限制生长
Pseudomonas fluorescens	$CH_{1.83}O_{0.55}N_{0.26}P_{0.024}$	5.5	无限制生长
Aerobacter aerogenes	$CH_{1.64}O_{0.52}N_{0.16}$	7.9	无限制生长
Penicillium chrysogenum	$CH_{1.70}O_{0.58}N_{0.15}$		葡萄糖限制，$D=0.038h^{-1}$
	$CH_{1.68}O_{0.53}N_{0.17}$		葡萄糖限制，$D=0.098h^{-1}$
Aspergillus niger	$CH_{1.72}O_{0.55}N_{0.17}$	7.5	无限制生长
平均	$CH_{1.81}O_{0.52}N_{0.21}$	6.0	

注：只列出了某些微生物的磷组分。*Penicillium chrysogenum* 的组分来自于Christensen et al（1995），其它数据来自于Roels（1983）。

在方程式（4.5）中，得率系数的单位为C-mol/C-mol生物质。方框4.1说明了如何将其它单位换算为此单位。方程式（4.5）［或方程式（4.4）］对检验实验数据的一致性是非常有用的。因此，假如生物质及代谢产物中的总碳不等于底物中的总碳，那么实验数据就出现了不一致性。

【例 4.2】 简单黑箱模型中的碳平衡

现在回到例 4.1 中的黑箱模型，用所指定的底物及代谢产物的元素组成重写方程式 (1)，对生物质，其元素组成为 $CH_{1.83}O_{0.56}N_{0.17}$，因此可得：

$$CH_{1.83}O_{0.65}N_{0.17}+Y_{xe}CH_3O_{0.5}+Y_{xc}CO_2+Y_{xw}H_2O-Y_{xs}CH_2O-Y_{xo}O_2-Y_{xN}NH_3=0 \tag{1}$$

也许发现将 $CH_3O_{0.5}$确认为乙醇很困难，但是当观察碳平衡式时就会立刻发现以 C-mol 为基础的优点：

$$1+Y_{xe}+Y_{xc}-Y_{xs}=0 \tag{2}$$

这个简单的方程对于检验实验数据的一致性很有用。因此，通过采用 Von Meyenburg (1969) 的经典数据，我们求出：在以葡萄糖限制、稀释速率为 $0.3h^{-1}$的连续培养中，$Y_{xe}=0.713$，$Y_{xc}=1.313$ 及 $Y_{xs}=3.636$。显然该数据是不一致性的，因为没有达到碳平衡。另外一个更详细的数据分析（Nielsen and Villadsen，1994）表明丢失的碳是乙醇，因为生物反应器中的很强的通气夹带会造成乙醇的蒸发。

与方程式（4.4）类似，氮平衡方程式为：

$$Y_{xN}=0.17 \tag{3}$$

或以比速率表示：

$$r_N=0.17\mu \tag{4}$$

如果所测定的氨吸收速率及生物质形成速率与方程式（4）不符，那么就可认定其中一项测量的数据不一致性或者生物质的氮含量与其所表示的不同。

与方程式（4.3）相似，可写出所有其它参与转化的元素平衡式［方程式（4.1）］。将生物质、底物及代谢产物的元素组成用矩阵 **E** 中的列表示，可以很方便写出这些元素的平衡式，矩阵 **E** 中的第一列为生物质的元素组成，第 2 列至第 $M+1$ 列为 M 个代谢产物的元素组成，第 $M+2$ 至第 $M+N+1$ 列为 N 个底物的元素组成。如果考虑 I 个元素（通常是 4 个，即 C、H、O、N），那么矩阵 **E** 中就有 I 行，并且 I 个元素平衡式可用同样数目的类似于方程式（4.3）的代数方程来表示，现概括为：

$$\mathbf{Er}=0 \tag{4.6}$$

其中共有 $N+M+1$ 个比速率（或体积速率）及 I 个限制条件，自由度为 $F=M+N+1-I$。如果恰好测定了 F 个速率，那么就有可能利用由方程式（4.6）给出的 I 个代数方程计算其它速率，但在这种情况下，就没有多余的数据用于检验数据的一致性。为此，明智的做法是应努力进行更多速率的测量，使之大于系统的自由度。

【例 4.3】 简单黑箱模型的元素平衡

回到例 4.1 及例 4.2 的黑箱模型，用前面所给出的生物质元素组成，可将元素组成的矩阵 **E** 写为：

$$\mathbf{E}=\begin{pmatrix} 1 & 1 & 1 & 0 & 1 & 0 & 0 \\ 1.83 & 3 & 0 & 2 & 2 & 0 & 3 \\ 0.56 & 0.5 & 2 & 1 & 1 & 2 & 0 \\ 0.17 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 1 \end{pmatrix}\begin{matrix} \leftarrow \text{carbon（碳）} \\ \leftarrow \text{hydrogen（氢）} \\ \leftarrow \text{oxygen（氧）} \\ \leftarrow \text{nitrogen（氮）} \end{matrix} \tag{1}$$

其中行分别代表碳、氢、氧、氮的含量，列分别代表生物质、乙醇、CO_2、水、葡萄糖、氧及氨的元素组成。利用方程式（4.6）（其中 **r** 被表示得率系数的向量所代替）可得到：

$$\begin{pmatrix} 1 & 1 & 1 & 0 & 1 & 0 & 0 \\ 1.83 & 3 & 0 & 2 & 2 & 0 & 3 \\ 0.56 & 0.5 & 2 & 1 & 1 & 2 & 0 \\ 0.17 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 1 \end{pmatrix} \begin{pmatrix} 1 \\ Y_{xe} \\ Y_{xc} \\ Y_{xw} \\ -Y_{xs} \\ -Y_{xo} \\ -Y_{xN} \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} 1+Y_{xe}+Y_{xc}-Y_{xs} \\ 1.83+3Y_{xe}+2Y_{xw}-2Y_{xs}-3Y_{xN} \\ 0.56+0.5Y_{xe}+2Y_{xc}+Y_{xw}-Y_{xs}-2Y_{xo} \\ 0.17-Y_{xN} \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} 0 \\ 0 \\ 0 \\ 0 \end{pmatrix} \qquad (2)$$

第一行及最后一行分别与由例 4.2 推导出的碳、氮平衡方程式相同。氢和氧的平衡式引入了两个附加的限制条件。但由于不可能测量水的生成速率，就必须用其中的一个方程计算该速率（或得率），那么上述两个平衡中就仅剩下一个附加限制条件了。

方框 4.1　以 C-mol 为基础计算得率

得率系数的单位通常为 $mol \cdot g^{-1}$（干重）或 $g \cdot g^{-1}$（干重），要将其转换为以 C-mol 为基础的单位，必须获得生物质的元素组成和灰分含量的信息。为了举例说明该转换过程，现将得率为 0.5g（干重）生物质（g 葡萄糖）$^{-1}$以 C-mol 来表示。首先将克干重的生物质转换成无灰分的基准，即确定由碳、氮、氢（有些情况还包括磷与硫）组成的生物质的量。若灰分为 8%，那么就可得到 0.92g 无灰分的生物质（g 干重生物质）$^{-1}$，据此可得 0.46g 无灰分的生物质（g 葡萄糖）$^{-1}$。使用单位为 $g \cdot C\text{-}mol^{-1}$的无灰分生物质及葡萄糖的摩尔质量，可将此得率直接转换为 C-mol 基准。生物质标准元素组成为 $CH_{1.8}O_{0.5}N_{0.2}$，其摩尔质量为 24.6g 无灰分生物质 $C\text{-}mol^{-1}$，因此可得到 0.46/24.6 = 0.0187C-mol 生物质·(g 葡萄糖)$^{-1}$。最后，乘以基准为 C-mol 的葡萄糖摩尔质量（$30g \cdot C\text{-}mol^{-1}$），可求出得率为 0.56C-mol 生物质·(C-mol 葡萄糖)$^{-1}$。

方程式（4.6）概括了所有元素的平衡。如例 4.3 中所讨论的，由于必须用氢或氧的平衡式计算（不可测量的）水的生成速率，实际上只有一个限制可供使用。显然通过消除 O 与 H 平衡之间水的得率系数就可将水排除。一个更高明的方法是使用所谓的“一般化的还原度”平衡法，是作为方程式（4.6）元素平衡式的线性组合而推导出的。这个平衡由 Roels（1983）引入，是 Erickson 等人（1978）早期研究的普遍化。将元素平衡式乘以特定因子并将其相加就得到该平衡式。通过选择合适的乘数因子，水、CO_2 及氮源的得率系数（或速率）就可从所产生的方程中被消除。为了说明该过程，现考虑例 4.3 给定的元素平衡，将碳、氢、氧、氮的平衡式分别乘以 4、1、−2 及 −3 可得到：

4	$+4Y_{xe}$	$+4Y_{xc}$		$-4Y_{xs}$			$=0$
1.83	$+3Y_{xe}$		$+2Y_{xw}$	$-2Y_{xs}$		$-3Y_{xN}$	$=0$
$(-2)0.56$	$+(-2)0.5Y_{xe}$	$+(-2)2Y_{xc}$	$+(-2)Y_{xw}$	$-(-2)Y_{xs}$	$-(-2)2Y_{xo}$		$=0$
$(-3)0.17$						$-(-3)Y_{xN}$	$=0$
4.20	$+6Y_{xe}$			$-4Y_{xs}$	$+4Y_{xo}$		$=0$

所产生的方程式就是该系统的一般化还原度平衡式。当然它并不独立于其它的元素平衡而存在，一般用它代替氧或氢平衡式，而另外的可用来计算水的生成速率。至此就得到碳、氮及还原度平衡，利用它们可检验数据的一致性或计算没能测定的速率。在 Erickson 等人（1978）的原始表达式中，C、H、O、N 平衡中的每一个乘数因子被解释为分别在 C、H、O、N 中可利用的自由电子数，它们被传递至氧，每个元素燃烧生成水、CO_2 及氨（作为氮源）。对于氮平衡来说，乘数因子总是取 -3，因为这是生物质中氮的主要价态。在 Roels 的一般化概念中，乘数因子是可自由选择的任意系数以使所得的水、CO_2 及氮源的系数变为零。按这种方法，如果使用了另外一种氮源如硝酸铵，为了消除一般化还原度平衡中氮源的得率系数，可对氮平衡选择不同的乘数因子。

在一般化还原度平衡式中与得率相乘的系数被称为相应物质的还原度，对上述系统，生物质的还原度为 4.2，乙醇为 6，葡萄糖为 4，水、氨及 CO_2 均为 0，氧为 -4。用 Roels 的结果，含氮物质的还原度取决于所用的氮源。在大多数情况下，氨或作为惟一氮源或与其它氮源相结合使用，于是形成元素组成为 $CH_aO_bN_c$ 的某物质的还原度 κ 的一般表达式：

$$\kappa = 4 + a - 2b - 3c \tag{4.7}$$

表 4.2 列出了发酵过程中通常所遇到的物质的还原度。关于还原度更详细的概念可参考 Roels（1983）或 Nielsen 和 Villadsen（1994）出版的书。引入物质还原度 κ 后，任何系统的一般化还原度平衡式为：

$$\kappa_x + \sum_{i=1}^{M} \kappa_{p,i} Y_{xp_i} - \sum_{i=1}^{N} \kappa_{s,i} Y_{xs_i} = 0 \tag{4.8}$$

该式非常有用，因为其容易建立，加上碳、氮平衡式，它就包括了由四种元素平衡所施加的全部限制条件。

表 4.2 标准条件下（298K，1atm，pH7），各种物质的燃烧热①

物质	分子式	还原度	$\Delta H^0_{c,i}$/kJ·C-mol^{-1}	物质	分子式	还原度	$\Delta H^0_{c,i}$/kJ·C-mol^{-1}
乙醛	C_2H_4O	5	583	甘油	$C_3H_8O_3$	4.67	554
乙酸	$C_2H_4O_2$	4	437	异丙醇	C_3H_8O	6	673
丙酮	C_3H_6O	5.33	597	乳酸	$C_3H_6O_3$	4	456
氨	NH_3		383③	乳糖	$C_{12}H_{22}O_{11}$	4	471
生物质	$CH_{1.8}O_{0.5}N_{0.2}$	4.2	560	苹果酸	$C_4H_6O_5$	3	332
丁醇	$C_4H_{10}O$	6	669	甲烷	CH_4	8	890③
丁酸	$C_4H_8O_2$	5	546	甲醇	CH_4O	6	727
柠檬酸	$C_6H_8O_7$	3	327	草酰乙酸	$C_2H_2O_4$	1	123
乙烷	C_2H_6	7	780③	棕榈酸	$C_{16}H_{32}O_2$	5.75	624②
乙醇	C_2H_6O	6	683	丙烷	C_3H_8	6.67	740③
甲醛	CH_2O	4	571③	丙酸	$C_3H_6O_2$	4.67	509
甲酸	CH_2O_2	2	255	琥珀酸	$C_4H_6O_4$	3.5	373
果糖	$C_6H_{12}O_6$	4	469	蔗糖	$C_{12}H_{22}O_{11}$	4	470
延胡索酸	$C_4H_4O_4$	3	334	尿素	CH_4ON_2		632
半乳糖	$C_6H_{12}O_6$	4	468	戊酸	$C_5H_{10}O_2$	5.2	568
葡萄糖	$C_6H_{12}O_6$	4	467				

① 以 CO_2、H_2O 和 N_2 为参比的燃烧热，1atm = 101325Pa。

② 固态。

③ 气态。

【例 4.4】 酵母厌氧培养的数据一致性分析

为了举例说明如何利用一般化还原度分析数据的一致性，我们使用由 Schulze（1995）获得的酿酒酵母厌氧连续培养的数据。在葡萄糖限制的条件下对葡萄糖（Y_{xs}）、乙醇（Y_{xe}）、CO_2（Y_{xc}）及甘油（Y_{xg}）的得率系数（单位为 C-mol 或 mol/C-mol 生物质）列出如下：

稀释率/h^{-1}	Y_{xs}	Y_{xe}	Y_{xc}	Y_{xg}
0.1	7.81	3.88	2.13	0.67
0.2	8.06	4.00	2.26	0.73

首先，碳平衡：

$$1 + Y_{xe} + Y_{xc} + Y_{xg} - Y_{xs} = 0 \tag{1}$$

在 $D=0.1h^{-1}$时误差在 2%以内及在 $D=0.2h^{-1}$时误差在 1%以内。这样的偏差（相对于以葡萄糖形式的碳的供应所评估）是非常满意的。

一般化还原度平衡式为：

$$\kappa_x + 6Y_{xe} + 4.67Y_{xg} - 4Y_{xs} = 0 \tag{2}$$

所确定的酵母的元素组成为 $CH_{1.78}O_{0.60}N_{0.19}$。因此生物质的还原度为 4.01，将前面表中的得率系数代入式（2），可知在这两种情况下一般化还原度平衡的偏差（同样，偏差是相对于葡萄糖）都在 3%以内。很有趣的情况是：当 $D=0.1h^{-1}$时，发现“丢失的碳”的还原度（也是利用碳平衡）非常接近于 6，这表明乙醇的测量值可能偏低。在产生挥发性物质的酵母及其它菌体培养过程中，这是一个普遍存在的问题，一般丢失的碳小于 2%左右是可以接受的。

4.3 热平衡

在底物转化成代谢产物和生物质的过程中，底物中部分 Gibbs 自由能以热的形式耗散于周围环境中。尤其在需氧条件下，散失的能量可能相当大。能量耗散可通过底物的总 Gibbs 自由能与从代谢产物及生物质回收的总 Gibbs 自由能之差来确定。通常，能量散失导致系统的焓和熵的变化，其很难量化（见 13.1 节）。因此人们的注意力通常集中于通过焓的变化所确定的热量产生，因为这种热量产生对过程温度控制冷却需要有直接的影响。在黑箱模型中，总过程的热量产生 Q_{heat}[kJ·(C-mol 生物质)$^{-1}$] 可用式（4.9）计算：

$$Q_{heat} = -\Delta H_c^0 = \sum_{i=1}^{N} Y_{xs_i}\Delta H_{c,i}^0 - \Delta H_{c,x}^0 - \sum_{i=1}^{M} Y_{xp_i}\Delta H_{c,i}^0 \tag{4.9}$$

式中，$\Delta H_{c,i}^0$为标准条件下（298K，1atm）（1atm = 101325Pa）第 i 个物质的燃烧热[kJ·(C-mol)$^{-1}$]。上式中得率系数以 C-mol 为基准。表 4.2 列出了发酵培养基中一些典型物质的燃烧热。应注意 Q_{heat}实际上是热的产生量而不是热的产生速率。为了确定热量产生的速率，可将上述方程乘以生长速率。方程式（4.9）对于由得率系数计算热量产生非常有用，并可用于设计生物反应器的冷却能力，如例 4.5 所说明的。

【例 4.5】 厌氧与需氧生长中的热量产生

现考虑在厌氧及需氧条件下酿酒酵母的生长，厌氧生长的黑箱模型为：

$$CH_{1.62}O_{0.53}N_{0.15}+4.78CH_3O_{0.5}+2.42CO_2+0.41H_2O-8.20CH_2O-0.15NH_3=0 \quad (1)$$

需氧生长的黑箱模型为：

$$CH_{1.62}O_{0.53}N_{0.15}+0.67CO_2+1.08H_2O-1.67CH_2O-0.15NH_3-0.64O_2=0 \quad (2)$$

现可计算出这两个反应的热量产生（下标 anarob 表示厌氧，aerob 表示需氧——译者注）为：

$$Q_{anarob}=8.20\times467+0.15\times383-560-4.78\times683$$
$$=62.11\text{kJ}\cdot(\text{C-mol 生物质})^{-1} \quad (3)$$

$$Q_{aerob}=1.67\times467+0.15\times383-560=277.3\text{kJ}\cdot(\text{C-mol 生物质})^{-1} \quad (4)$$

由此可看出，需氧过程产生的热量［相当于 165kJ·(C-mol 代谢的葡萄糖)$^{-1}$］远大于厌氧过程［相当于 8kJ·(C-mol 葡萄糖)$^{-1}$］。因此，在需氧过程下，最初存在于葡萄糖中的大部分自由能以热的形式散失，而在厌氧条件下，其回收于乙醇中。为了说明大规模生物反应器的冷却要求，现计算一个典型的工业面包酵母发酵的总生成热量。生物反应器体积为 100m^3，生物质浓度为 50g·L^{-1}（约相当于 1.96 C-mol·L^{-1}）。对于分批式操作，其比生长速率约等于 0.25h^{-1}，利用这些数据首先可得到热量产生的比速率为：

$$r_q=Q_{aerob}\mu=[277.3\text{kJ}\cdot(\text{C-mol 生物质})^{-1}]\times(0.25\text{h}^{-1})$$
$$=69\text{kJ}\cdot(\text{C-mol 生物质})^{-1}\cdot\text{h}^{-1} \quad (5)$$

据此求出总热量产生为：

$$[69\text{kJ}\cdot(\text{C-mol 生物质})^{-1}\cdot\text{h}^{-1}]\times(1.96\text{C-mol}\cdot\text{L}^{-1})\times(100.000\text{L})=3.8\text{MW} \quad (6)$$

这么大的热量产生清楚地表明需要大量的冷却水以维持生物反应器恒温。

如果能精确测量热量生成速率，例如使用热量计［正如在几个出版物中已列举的，如参见 Larsson 等（1991）及 Von stockar 和 Birou（1989）］或测量反应器中的温度变化，那么热平衡式［方程式（4.9）］与 4.2 节的元素平衡式一起就可提供一个额外的冗余。然而，如不能测定热量生成速率（例如在厌氧条件下，生成的热量很小），那么引入一个附加的方程并不能改变自由度，这是由于所附加了未知变量（Q_{heat}）。对于需氧过程，通常发现热量生成速率与氧吸收率成正比：

$$Q_{heat}=\alpha Y_{xo} \quad (4.10)$$

经验发现式（4.10）适用于在不同底物上的微生物生长，式中比例常数约等于 460kJ/mol O_2［见表 4.3 及例 4.3，其值为 433kJ·(mol O_2)$^{-1}$］。方程式（4.10）也可从一般化还原度平衡导出，其中以 N_2 作为含氮物质的参照物（Roels，1983；Nielsen and Villladsen，1994）。方程式（4.10）的一个推论是：热量生成速率的测量很适合于检验氧吸收速率的测量，或者可作为这种测量的一种替代。

表 4.3 利用不同碳源生长的细菌的 Y_{xo}及 Q_{heat}比较

底 物	Y_{xo} /mmol O_2·g^{-1} (干重)	Q_{heat} /kJ·g^{-1} (干重)	Q/Y_{xo} /kJ·(mol O_2)$^{-1}$	底 物	Y_{xo} /mmol O_2·g^{-1} (干重)	Q_{heat} /kJ·g^{-1} (干重)	Q/Y_{xo} /kJ·(mol O_2)$^{-1}$
苹果酸	30.6	14.0	458	乙醇	51.2	23.2	453
乙酸	44.6	19.9	446	异丙醇	135.8	56.5	416
葡萄糖	21.3	10.0	469	石蜡	62.5	26.2	419
甲醇	71.0	34.9	492	甲烷	156.3	68.6	439

注：数据取自 Abbott 及 Clamen（1973）。

4.4 超定系统的分析——过失测量误差的识别

如果可获得的测量数目大于自由度 F，该系统通常被称为超定系统。在此情况下，测量的冗余可用于：(1) 计算没测量的代谢物的速率；(2) 通过运用本质上的最小二乘计算提高可利用的测量的精度；(3) 识别最可能的过失测量误差来源或甚至在黑箱模型框架构建中不一致性的来源。这可以直接的方式进行。例如，若只有一个速率没测量，我们可以用碳平衡计算该速率并且用剩下的（氮及还原度）平衡来检验数据的总体一致性。有一种更有效的分析方法是基于同时使用所有的平衡（元素的及其它的）来计算没被测量的速率及进行数据一致性分析。最好运用矩阵运算来进行。这里，我们遵从这个程序，然而，为了便于对该法接触有限的读者的理解，已将矩阵运算的运用减至最少。另外，在方框 4.2 中还介绍了矩阵的基本运算。最后，提供几个例子用以说明应用于无酒精生成的酵母有氧培养时这些运算方法的运用。

现以方程式（4.6）的元素平衡式作为分析的开始，以如下方式重写该式，即将速率向量 $\mathbf{r}$ 分为两个向量：一个是 $\mathbf{r}_m$，其包括所有已测量的速率，另一个是 $\mathbf{r}_c$，其包括剩余的速率（指需计算的速率，因此下标为 c），得到式（4.11）：

$$\mathbf{Er} = \mathbf{E}_c\mathbf{r}_c + \mathbf{E}_m\mathbf{r}_m = 0 \tag{4.11}$$

同样可将元素矩阵 $\mathbf{E}$ 按列分为两部分 $\mathbf{E}_m$ 和 $\mathbf{E}_c$。将 $\mathbf{E}$ 中已测速率的物质所在的全部列放入 $\mathbf{E}_m$ 中，将 $\mathbf{E}$ 中没测速率的物质（即必须从平衡中要计算的）所在的全部列放入 $\mathbf{E}_c$ 中。当然，如果刚好测量了 F 个变量，那么就有正好足够多的方程用于计算没测量的速率。在这种情况下，$\mathbf{E}_c$ 是一个方阵（$I \times I$），其维数等于限制条件件数（或平衡数，I）。若 $\mathbf{E}_c$ 为满秩，即秩（$\mathbf{E}_c$）$= I$（见方框 4.2），那么解方程式（4.11）就可计算出没测量的比速率 $\mathbf{r}_c$：

$$\mathbf{r}_c = -\mathbf{E}_c^{-1}\mathbf{E}_m\mathbf{r}_m \tag{4.12}$$

如果 $\mathbf{E}_c$ 为方阵而且满秩，则该系统被称为可观测的，因为它有恰好足够多的测量值用于计算未知的速率，即系统是超定的。若所测量的速率的数目大于自由度 F，所得到的方程数目就大于计算未知速率所需的最少方程数目。在此情况下，通常使用最小二乘法，从可利用的平衡方程的组合来计算未知速率以提高所得估值的精确性。这种情况的等价矩阵是元素子矩阵 $\mathbf{E}_c$，其不是方阵，因此不能求其逆矩阵。但将方程式（4.11）乘以 $\mathbf{E}_c$ 的转置矩阵 $\mathbf{E}_c^T$（见方框 4.2）就得到：

$$\mathbf{E}_c^T(\mathbf{E}_c\mathbf{r}_c + \mathbf{E}_m\mathbf{r}_m) = (\mathbf{E}_c^T\mathbf{E}_c)\mathbf{r}_c + \mathbf{E}_c^T\mathbf{E}_m\mathbf{r}_m = 0 \tag{4.13}$$

$\mathbf{E}_c^T\mathbf{E}_c$ 肯定是方阵（见方框 4.2），而且如果满秩，就可求逆，并进而给出 $\mathbf{r}_c$ 的解：

$$\mathbf{r}_c = -\mathbf{E}_c^{\#}\mathbf{E}_m\mathbf{r}_m \tag{4.14}$$

式中，$\mathbf{E}_c^{\#}$ 为拟逆矩阵（或 Moore-Penrose 逆矩阵）：

$$\mathbf{E}_c^{\#} = (\mathbf{E}_c^T\mathbf{E}_c)^{-1}\mathbf{E}_c^T \tag{4.15}$$

式（4.14）本质上是向量 $\mathbf{r}_c$ 中未测量速率的最小二乘估计，其用了所有的平衡以确定这些速率。可以表明，若 $\mathbf{E}_c$ 为满秩（即至少线性无关的平衡方程的数目与未测速率的数目一样多），那么 $\mathbf{E}_c^T\mathbf{E}_c$ 也为满秩并且其拟逆矩阵也可求出。

在超定系统情况下，用方程式（4.14）计算出未测量速率（$\mathbf{r}_c$）之后，可能还留着一个未使用的平衡式，其可用来检验所测量的和所计算的速率的整体一致性，为此，将方程式（4.14）代入方程式（4.11）得到：

$$\mathbf{R}\mathbf{r}_{\mathrm{m}}=0 \tag{4.16}$$

式中，**R** 被称为冗余矩阵（Van der Heijden et al，1994a，b）：

$$\mathbf{R}=\mathbf{E}_{\mathrm{m}}-\mathbf{E}_{\mathrm{c}}(\mathbf{E}_{\mathrm{c}}^{T}\mathbf{E}_{\mathrm{c}})^{-1}\mathbf{E}_{\mathrm{c}}^{T}\mathbf{E}_{\mathrm{m}} \tag{4.17}$$

冗余矩阵的秩数表示必须由测量的和计算的［按式（4.14）］速率所满足的独立方程的数目，因此冗余矩阵含有 I-秩（**R**）个相关的行。如果去掉相关行，就得到关联所测变量的秩（**R**）个独立方程，即

$$\mathbf{R}_{\mathrm{r}}\mathbf{r}_{\mathrm{m}}=0 \tag{4.18}$$

$\mathbf{R}_{\mathrm{r}}$ 为缩减的冗余矩阵，它只含矩阵 **R** 中的独立行。方程式（4.16）是进一步分析过失误差识别的基础。在继续此项工作之前，将首先举例说明上述概念及确定 $\mathbf{R}_{\mathrm{r}}$ 的方法（见例 4.6～例 4.8）。

方框 4.2　矩阵运算

矩阵只是按某种点阵形式排列的一组数。本文中所用到的点阵或者是多组分的某一向量形式或是一个方的/矩形的阵。在此将介绍本书用到的最简单的矩阵运算［更详细的可参见 Strang（1988）］。

考虑一个两行两列的普通矩阵 **A**：

$$\mathbf{A}\begin{pmatrix}A_{1,1} & A_{1,2}\\ A_{2,1} & A_{2,2}\end{pmatrix}$$

在矩阵表示法中 A_{ij} 指第 i 行第 j 列的元素，其中 $i=1\cdots n$，$j=1\cdots m$，其阶数以 $n\times m$ 表示，在此情况下 **A** 为 2×2 矩阵。

矩阵的基本运算

考虑上述矩阵 **A** 及另一个 2×2 矩阵 **B**：

$$\mathbf{B}\begin{pmatrix}B_{1,1} & B_{1,2}\\ B_{2,1} & B_{2,2}\end{pmatrix}$$

矩阵 **A** 与 **B** 的和及差分别为 2×2 矩阵 **C** 与 **D**：

$$\mathbf{C}=\mathbf{A}+\mathbf{B}=\begin{pmatrix}A_{1,1}+B_{1,1} & A_{1,2}+B_{1,2}\\ A_{2,1}+B_{2,1} & A_{2,2}+B_{2,2}\end{pmatrix}$$

$$\mathbf{D}=\mathbf{A}-\mathbf{B}=\begin{pmatrix}A_{1,1}-B_{1,1} & A_{1,2}-B_{1,2}\\ A_{2,1}-B_{2,1} & A_{2,2}-B_{2,2}\end{pmatrix}$$

矩阵与某个常数的数积等于该数乘以各矩阵元素形成的矩阵，例如：

$$\mathbf{E}=2\mathbf{A}=2\begin{pmatrix}A_{1,1} & A_{1,2}\\ A_{2,1} & A_{2,2}\end{pmatrix}=\begin{pmatrix}2A_{1,1} & 2A_{1,2}\\ 2A_{2,1} & 2A_{2,2}\end{pmatrix}$$

某一向量与矩阵相乘或矩阵之间的相乘较复杂，现举例如下。考虑一个向量 **v**，**v** 的元素数目等于 **A** 的列数：

$$\mathbf{v}=\begin{pmatrix}v_1\\ v_2\end{pmatrix}$$

A 与 **v** 相乘可得到：

$$\mathbf{F}=\mathbf{A}\mathbf{v}=\begin{pmatrix}A_{1,1} & A_{1,2}\\ A_{2,1} & A_{2,2}\end{pmatrix}\begin{pmatrix}v_1\\ v_2\end{pmatrix}=\begin{pmatrix}A_{1,1}v_1+A_{1,2}v_2\\ A_{2,1}v_1+A_{2,2}v_2\end{pmatrix}$$

在本质上，**F** 中的每一个元素为 **A** 的相应行与 **v** 的乘积之和。对于阶数为 $m\times n$ 的 **A** 及阶数为 $r\times 1$ 的向量 **v**，显然 r 必等于 n（即 **A** 的列数），乘积矩阵为 $m\times n$。

用类似的方式，可将两个阶数相配的矩阵相乘，**A** 中的每一行乘以 **B** 中相应的列得到 2×2 矩阵 **G**：

$$\mathbf{G}=\mathbf{AB}=\begin{bmatrix}A_{1,1} & A_{1,2}\\ A_{2,1} & A_{2,2}\end{bmatrix}\begin{bmatrix}B_{1,1} & B_{1,2}\\ B_{2,1} & B_{2,2}\end{bmatrix}=\begin{bmatrix}A_{1,1}B_{1,1}+A_{1,2}B_{2,1} & A_{1,1}B_{1,2}+A_{1,2}B_{2,2}\\ A_{2,1}B_{1,1}+A_{2,2}B_{2,1} & A_{2,1}B_{1,2}+A_{2,2}B_{2,2}\end{bmatrix}$$

矩阵相乘是可结合的及可分配的但不可交换，即$(\mathbf{AB})\mathbf{C}=\mathbf{A}(\mathbf{BC})$，$\mathbf{A}(\mathbf{B}+\mathbf{C})=\mathbf{AB}+\mathbf{AC}$，但 $\mathbf{AB}\neq\mathbf{BA}$。

例 1

考虑含有下列元素值的矩阵 **A**、**B** 及向量 **v**。作为练习，建议读者重新计算其结果。

$$\mathbf{A}=\begin{pmatrix}0 & 1\\ 2 & 3\end{pmatrix}\qquad \mathbf{B}=\begin{pmatrix}4 & 3\\ 2 & 2\end{pmatrix}\qquad \mathbf{v}=\begin{pmatrix}3\\ 5\end{pmatrix}$$

$$\mathbf{A}+\mathbf{B}=\begin{pmatrix}4 & 4\\ 4 & 5\end{pmatrix}\qquad \mathbf{A}-\mathbf{B}=\begin{pmatrix}-4 & -2\\ 0 & 1\end{pmatrix}$$

$$2\mathbf{A}=\begin{pmatrix}0 & 2\\ 4 & 6\end{pmatrix}\qquad \mathbf{Av}=\begin{pmatrix}5\\ 21\end{pmatrix}\qquad \mathbf{AB}=\begin{pmatrix}2 & 2\\ 14 & 12\end{pmatrix}$$

矩阵的转置

以 $\mathbf{A}^T$ 表示 **A** 的转置矩阵，$\mathbf{A}^T$ 中的列直接取自于 **A** 的行，即 **A** 的第 i 行变为 $\mathbf{A}^T$ 的第 i 列。因此对一般情况：

$$\mathbf{A}^T=\begin{bmatrix}A_{1,1} & A_{1,2}\\ A_{2,1} & A_{2,2}\end{bmatrix}^T=\begin{bmatrix}A_{1,1} & A_{2,1}\\ A_{1,2} & A_{2,2}\end{bmatrix}$$

注意，**AB** 的转置矩阵是：$(\mathbf{AB})^T=\mathbf{A}^T\mathbf{B}^T$

矩阵的逆

某一 $n\times n$ 矩阵 **A** 的逆以 $\mathbf{A}^{-1}$表示，它是另一个 $n\times n$ 的矩阵 **B**，因此，$\mathbf{AB}=\mathbf{BA}=\mathbf{I}$，**I** 为所谓的单位矩阵，在其对角线元素均为 1，其余均为 0。例如当 $n=2$ 时 **I** 为：

$$\mathbf{I}=\begin{pmatrix}1 & 0\\ 0 & 1\end{pmatrix}$$

矩阵 **A** 的逆矩阵计算如下：

$$\mathbf{A}^{-1}=\begin{bmatrix}A_{1,1} & A_{1,2}\\ A_{2,1} & A_{2,2}\end{bmatrix}^{-1}=\frac{1}{\det(\mathbf{A})}\begin{bmatrix}A_{2,2} & -A_{1,2}\\ -A_{2,1} & A_{1,1}\end{bmatrix}$$

det（**A**）是 **A** 的行列式，表示如下：

$$\det(\mathbf{A})=\det\begin{bmatrix}A_{1,1} & A_{1,2}\\ A_{2,1} & A_{2,2}\end{bmatrix}=\left|\begin{bmatrix}A_{1,1} & A_{2,1}\\ A_{1,2} & A_{2,2}\end{bmatrix}\right|=A_{1,1}A_{2,2}-A_{1,2}A_{2,1}$$

对于阶数大于 2×2 的矩阵的行列式的运算可参考线性代数教科书［例如 Strang (1988)］。当 **A** 的行列式 det（**A**）为零时，**A** 的逆不存在，注意到这点很重要。这种不能求逆的矩阵通常称为奇异矩阵。还有一点应注意：$(\mathbf{A}^{-1})^T=(\mathbf{A}^T)^{-1}$

矩阵的另一个重要性质是矩阵的秩（r），其相应于该矩阵中真正独立的行的数目。对 $n\times n$ 的方阵 **A**，当 $r=n$ 时，可证明：(1) **A** 的逆存在，(2) 且它的逆是惟一的。

例 2

对于例 1 中的矩阵 **A** 和 **B**，其 det(**A**) = −2 及 det(**B**) = 2，这表明它们是非奇异矩阵，它们是逆存在。计算如下：

$$\mathbf{A}^{-1}=\begin{pmatrix}A_{1,1} & A_{1,2}\\ A_{2,1} & A_{2,2}\end{pmatrix}^{-1}=\begin{pmatrix}-1.5 & 0.5\\ 1 & 0\end{pmatrix}$$

$$\mathbf{B}^{-1}=\begin{pmatrix}B_{1,1} & B_{1,2}\\ B_{2,1} & B_{2,2}\end{pmatrix}^{-1}=\begin{pmatrix}1 & -1.5\\ -1 & 2\end{pmatrix}$$

这种 2×2 的系统很容易在纸上运算。然而对于阶数高的矩阵，为了便于运算，应使用 MATLAB、MATHCAD 或 MATHEMATICA 等软件包。

【例 4.6】 无乙醇生成的酵母需氧培养过程分析

现在回到酵母需氧培养的情况，其在例 4.1～例 4.3 已被讨论过，但现在只考虑不生成乙醇的情况。此时 Y_{xe}为 0，所以在黑箱模型中将不包括乙醇。于是以 μ、r_c、r_w、r_s、r_o 及 r_N 表示模型中的速率。运用葡萄糖、氧的比吸收速率，CO_2 的比生成率及生物质比生长速率（它等于处于稳态的恒化器的稀释速率）的测量数据，元素矩阵可划分如下：

$$\begin{matrix} & \text{葡萄糖} & O_2 & CO_2 & \text{生物质} & & & NH_3 & H_2O \end{matrix}$$

$$\mathbf{E}_m=\begin{pmatrix}1 & 0 & 1 & 1\\ 2 & 0 & 0 & 1.83\\ 1 & 2 & 2 & 0.56\\ 0 & 0 & 0 & 0.17\end{pmatrix};\quad \mathbf{E}_c=\begin{pmatrix}0 & 0\\ 3 & 2\\ 0 & 1\\ 1 & 0\end{pmatrix} \tag{1}$$

其中矩阵 $\mathbf{E}_m$ 的 4 个列分别对应于葡萄糖、氧、CO_2 及生物质的 4 个速率，矩阵 $\mathbf{E}_c$ 中的两个列分别对应于氨和水的速率。当然，上述两个矩阵中的行代表四个元素平衡方程式。对于含有 6 个化合物及 4 个元素平衡式的系统，其自由度 F 为 2。因为有 4 个速率可以测定，所以它是超定系统。利用方程式（4.17）可得冗余矩阵：

$$\mathbf{R}=\begin{pmatrix}1 & 0 & 1 & 1\\ 0 & -0.286 & -0.286 & 0.014\\ 0 & 0.572 & 0.572 & -0.028\\ 0 & 0.858 & 0.858 & -0.042\end{pmatrix} \tag{2}$$

矩阵 **R** 的秩为 2。很容易发现，**R** 中的最后两行与第二行成比例（第二行乘以 −2 及 −3分别与第三、四行相等）。因此消去这两行就得到化简的冗余矩阵：

$$\mathbf{R}_r=\begin{pmatrix}1 & 0 & 1 & 1\\ 0 & -0.286 & -0.286 & 0.014\end{pmatrix} \tag{3}$$

方程（3）与 4 个所测定的比速率一起，根据方程式（4.18）就可得到下列冗余方程：

$$\mathbf{R}_r\mathbf{r}_m=\begin{pmatrix}-r_s+r_c+\mu\\ 0.286r_o-0.286r_c+0.014\mu\end{pmatrix}=\begin{pmatrix}0\\ 0\end{pmatrix} \tag{4}$$

显然第一行被认定为碳平衡式，但第二行就不那么容易确认，尽管其包含了来自其它三个元素平衡限制条件的全部信息。

通常实验数据充满噪声并且在某些情况下甚至出现系统误差。由于这些误差，方程式（4.16）通常不准确。用所测量的速率（或得率）乘以化简的冗余矩阵时，结果不为零。这一点用式（4.19）能更好地表示：

$$\overline{\mathbf{r}_m} = \mathbf{r}_m + \delta \tag{4.19}$$

式中，$\overline{\mathbf{r}_m}$为测量的速率的向量；$\mathbf{r}_m$ 为实际速率向量；δ 为其不可靠的总的测量误差。将方程式（4.19）代入式（4.18）就得到残差的向量 ε，如式（4.20）所示：

$$\varepsilon = \mathbf{R}_r \overline{\mathbf{r}_m} = \mathbf{R}_r(\mathbf{r}_m + \delta) = \mathbf{R}_r\delta \tag{4.20}$$

如果该模型正确并且无系统或随机误差存在，即 $\delta = 0$，那么所有方程［方程式（4.18）］均能被完全满足且残差为零。但在所有数据组中，测量中存在噪声使得残差向量不为零。最好的速率估计是使残差最小，可通过如下过程确定。

假设误差向量服从正态分布，其平均值为零，方差-协方差矩阵为 $\mathbf{F}$：

$$E(\varepsilon) = 0 \tag{4.21}$$

$$\mathbf{F} \equiv E[(\overline{\mathbf{r}_m} - \mathbf{r}_m)(\overline{\mathbf{r}_m} - \mathbf{r}_m)^T] = E(\delta\delta^T) \tag{4.22}$$

式中，E 为期望值算子，能够表明残差也是服从正态分布且均值为零：

$$E(\varepsilon) = \mathbf{R}_r E(\delta) = 0 \tag{4.23}$$

方差-协方差矩阵为：

$$\mathbf{P} = E(\varepsilon\varepsilon^T) = \mathbf{R}_r E(\delta\delta^T)\mathbf{R}_r^T = \mathbf{R}_r\mathbf{F}\mathbf{R}_r^T \tag{4.24}$$

误差向量 δ 的最小方差估计是通过根据其方差所衡量的误差平方和最小而得到的：

$$\min_{\delta}(\delta^T\mathbf{F}^{-1}\delta) \tag{4.25}$$

其解为：

$$\hat{\delta} = \mathbf{F}\mathbf{R}_r^T\mathbf{P}^{-1}\varepsilon = \mathbf{F}\mathbf{R}_r^T\mathbf{P}^{-1}\mathbf{R}_r\mathbf{r}_m \tag{4.26}$$

这里符号“ ^”表示 δ 的值是一个估计值。因为 δ 为正态分布，方程式（4.25）中的函数最小化就如同最小二乘最小化问题及最大似然最小化问题。若误差向量不是正态分布，方程式（4.26）的估计值仍可用于最小二乘最小化问题，但不再是最大似然估计（wang 及 Stephanopoulos，1983）。利用方程式（4.26），可得到所测量速率的最佳估计值为：

$$\hat{\mathbf{r}}_m = \overline{\mathbf{r}_m} - \hat{\delta} = (\mathbf{I} - \mathbf{F}\mathbf{R}_r^T\mathbf{P}^{-1}\mathbf{R}_r)\overline{\mathbf{r}_m} \tag{4.27}$$

其中 $\mathbf{I}$ 为单位矩阵。可以表明，通过方程式（4.27）得到的所测量速率的估计值的标准偏差小于原始测量值的标准偏差（wang 及 Stephanopoulos，1983），因此该值很可能比实测的数据更可靠。通过利用所测量速率的最佳估计值及方程式（4.14），就可计算出黑箱模型中的未测量的速率。

【例 4.7】 无乙醇生成的酵母需氧培养过程分析（续）

现在继续分析例题 4.6 开始的酵母需氧培养过程，该例已推导出了化简的冗余矩阵。当稀释速率为 0.15h^{-1}时，葡萄糖、氧、CO_2 及生物质的比速率的测量值为：

$$\overline{\mathbf{r}_m} = \begin{pmatrix} -r_s \\ -r_o \\ \mu \\ r_c \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} -0.250 \\ -0.113 \\ 0.113 \\ 0.141 \end{pmatrix} \tag{1}$$

这里，所有速率的单位均为 C-mol·(C-mol 生物质·h)$^{-1}$。假定生物质及葡萄糖的测量误差为 5%，气体的测量误差为 10%（即氧与 CO_2 的测量），现在要计算所测量速率的最佳估计值。对于这些误差，其方差-协方差矩阵为：

$$\mathbf{F}=10^{-3}\begin{pmatrix}0.1563 & 0 & 0 & 0\\ 0 & 0.1277 & 0 & 0\\ 0 & 0 & 0.0139 & 0\\ 0 & 0 & 0 & 0.1988\end{pmatrix} \tag{2}$$

利用方程式（4.24）可得：

$$\mathbf{P}=10^{-3}\begin{pmatrix}0.3870 & -0.0563\\ -0.0563 & 0.0267\end{pmatrix} \tag{3}$$

化简的冗余矩阵来自例 4.6。根据方程式（4.26）可得到所测量通量的误差向量为：

$$\hat{\delta}=\begin{pmatrix}-0.0055\\ 0.0115\\ -0.0013\\ 0.0108\end{pmatrix} \tag{4}$$

由此导致所测量通量的最佳估计值：

$$\hat{\mathbf{r}}_m=\begin{pmatrix}-0.2445\\ -0.1245\\ 0.1143\\ 0.1302\end{pmatrix} \tag{5}$$

由此，仅对测量值有很小的校正，因而原始测量值似乎是很好。然而已校正的测量值更符合元素平衡方程，所以它们比原始测量值更好。

通常方差-协方差矩阵假定为对角矩阵，它意味着这些测量值是不相关的。然而比速率、得率系数甚至体积速率很少是直接测量而是从基本变量的测量值中导出来的，这可影响到不只一个所测定的速率。一个例子是氧吸收速率及 CO_2 生成速率的测量，二者均基于流过生物反应器中的气体流速的测量、连同罐顶气相中两种气体的分压的测量。若气体流速测量有误差，它对两个速率均有影响。因此所测量的速率中的误差就间接相关。对其它速率的测量也存在同样的缺点，这些速率一般是通过将浓度测量与流速测量相结合而得到的。在所有具有间接误差相关的情况下，指定真实的方差-协方差矩阵 **F** 是很困难的。Madron 等人(1977）提出了一个简单的算法，当基本变量的噪声性质已知时，用该算法就可建立真实的方差-协方差矩阵（见方框 4.3）。但在很多情况下，即使是对基本变量的噪声，我们只有不充分的信息，因此就不能导出真实的方差-协方差矩阵。在这些情况下，可以忽略协方差并利用一个对角方差-协方差矩阵，其中采用了误差的合理值。此外，还可用下式进行最小二乘估计：

$$\mathbf{r}_m=[\mathbf{I}-\mathbf{R}_r^T(\mathbf{R}_r\mathbf{R}_r^T)^{-1}\mathbf{R}_r]\overline{\mathbf{r}_m} \tag{4.28}$$

它是基于所有所测量的速率均具有相同的绝对误差这一假设的。由于使用了误差的绝对值，当变量的数量级相同时使用方程式（4.28）才是合理的。

若任何约束残差与零相差很大，那么或是至少某一个测量有系统误差或是所用的模型不正确。为了量化“与零相差很大”这个说法，可引入检验函数 h，它等于残差的加权平

方和：

$$h=\varepsilon^T\mathbf{P}^{-1}\varepsilon \tag{4.29}$$

当原始测量不相关时，检验函数 h 为 χ^2 分布（wang 和 Stephanopoulos，1983），对于相关的原始数据，已表明也是这种情况（Van der Heijden 等，1994b）。χ^2 分布的自由度等于 $\mathbf{P}$ 的秩，也等于 $\mathbf{R}$ 的秩，即独立限制条件数。在自由度等于 $\mathbf{R}$ 的秩的条件下，将检验函数 h 的计算值与 χ^2 分布的值相比，就有可能在某一置信水平检验数据的系统误差。因此，假如在一个足够高的置信水平下所得到的检验函数值大于 χ^2 分布值，那么数据或模型就有问题。表 4.4 列出了在不同置信水平及不同自由度下的 χ^2 分布值。

表 4.4　χ^2 分布值

自由度	置信水平					
	0.500	0.750	0.900	0.950	0.975	0.990
1	0.46	1.32	2.71	3.84	5.02	6.63
2	1.39	2.77	4.61	5.99	7.38	9.21
3	2.37	4.11	6.25	7.81	9.35	11.30
4	3.36	5.39	7.78	9.49	11.10	13.30
5	4.35	6.63	9.24	11.10	12.80	15.10

方框 4.3　基本变量误差的方差-协方差矩阵计算

通常所测的速率是由所谓的基本变量的测量值确定的，例如，在稳态恒化器中葡萄糖的体积吸收速率是作为加料中与反应器中的葡萄糖浓度之差与稀释速率的乘积而确定的。因此方差-协方差矩阵的详细表述不是直截了当的。Madron 等（1977）提出了一个利用基本变量的测量噪声来计算 $\mathbf{F}$ 的简单方法。首先，将所测量的速率表示为基本变量的函数。以向量 y 表示这些基本变量时，可得第 i 个速率：

$$r_{\mathrm{m},i}=f_i(y) \tag{1}$$

通常函数 f_i 是非线性的，为了获得方差及协方差的近似估计值，需将这些函数线性化。所测的第 i 个速率的误差 δ_j 以基本变量误差 δ_j^* 的线性组合来表示：

$$\delta_i=\sum_{j=1}^{k}\left(\frac{\partial f_i}{\partial y_j}\right)\delta_i^*=\sum_{j=1}^{k}g_{ij}\delta_j^* \tag{2}$$

式中，k 为基本变量的个数；g_{ij} 为敏感度。若将敏感度纳入矩阵 $\mathbf{G}$ 中，那么方差-协方差矩阵 $\mathbf{F}$ 可通过下式计算：

$$\mathbf{F}=\mathbf{G}\mathbf{F}^*\mathbf{G}^T \tag{3}$$

式中，$\mathbf{F}^*$ 是含有基本变量方差的对角矩阵。用上述方法计算协方差非常简便，但很明显，所计算的结果由方程式（2）线性化的精确度所限制。

【例 4.8】　无乙醇生成的酵母好氧培养过程分析（续）

现在我们继续分析在例 4.6 中提出的并在例 4.7 中进一步分析的酵母好氧培养过程。根据例 4.7 中推导出的矩阵，用方程式（4.20）可计算残差：

$$\varepsilon = \begin{pmatrix} 0.0040 \\ -0.0064 \end{pmatrix} \tag{1}$$

用方程式（4.29）可计算出检验函数的值：

$$h = \varepsilon^T \mathbf{P}^{-1} \varepsilon = 1.87 \tag{2}$$

因为在化简的冗余矩阵中有两个独立的行，所以其秩为 2，即检验函数的值需与自由度为 2 的 χ^2 分布值相比较。从表 4.4 可看出，即使置信水平为 0.75，检验函数的值也小于 χ^2 分布值。因此，只有在置信水平非常低时，才能得出数据含有过失误差的结论，所以数据的质量令人满意。

在一给定的置信水平下，求得一个大的检验函数，$h > \chi^2$，并不容许人们得出结论是否不满意的大的系统误差是由于数据的系统误差还是由于大的随机误差所造成的。有一个方法可解决此问题，即在给定的数据中一次消除一个测量值，然后利用某一限制条件计算该测量值，其余的限制条件用于一致性分析，以重新计算检验函数 h 并与少了一个自由度的 χ^2 统计值相比较。如果消除某一测量值后所得到的检验函数值显著地小，这就足以证明所消除的测量值中有过失（系统）误差存在。这同样适用于除元素平衡式之外的其它限制条件，例如那些对胞内代谢物作稳态假定所产生的限制等。这种误差诊断的方法需要系统是超定系统而且至少有两个冗余测量，即秩($\mathbf{R}$)$\geqslant$2。这种超定系统便于一个限制用于计算所消除的测量，其它的限制用于重新计算检验函数。测量消除的步骤很简单，如例 4.9 所述，它能迅速确定某一系统误差的可能来源。

【例 4.9】 酵母培养测量的误差诊断

对于以葡萄糖为碳源、氨为氮源的酿酒酵母需氧生长，当比生长速率为 0.008h^{-1}时，葡萄糖及氧的比吸收速率、生物质比生长速率和 CO_2 比生成速率［所有速率以 C-mol·(C-mol 生物质·h)$^{-1}$表示］的测量值为：

$$\mathbf{r} = \begin{pmatrix} -r_s \\ -r_o \\ \mu \\ r_c \end{pmatrix} = 0.008 \begin{pmatrix} -2.1 \\ -3.8 \\ 1 \\ 1.4 \end{pmatrix} \tag{1}$$

生物质的元素组成假定与例 4.6～例 4.8 相同。葡萄糖、氧、生物质及 CO_2 的测量误差分别为 6%、11.7%、5%及 11.1%，无协方差。现在要检验是否有实验误差。因为化学计量反应式及所测的速率均与例 4.6～例 4.8 相同，因此可用例 4.6 导出的化简冗余矩阵。此外，利用给定的误差可得方差-协方差矩阵：

$$\mathbf{F} = 10^{-4} \begin{pmatrix} 0.0102 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0.1265 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0.0016 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0.0155 \end{pmatrix} \tag{2}$$

按例 4.8 计算检验函数，可得到：

$$h = 35.06 \tag{3}$$

它表示即使在0.99的置信水平仍有测量误差。审视所测定的速率似乎可发现误差或存在于氧或存在于CO_2的测量中，因为呼吸商（$RQ=r_c/r_o$）小于1，而酿酒酵母在低比生长速率进行需氧培养时的正常呼吸商为1。为了确定测量误差，每次一个，分别消除四个反应速率，然后计算检验函数，其结果如下：

所消除的化合物	h（检验函数）	所消除的化合物	h（检验函数）
葡萄糖	27.06	生物质	26.43
氧	2.12	CO_2	34.96

显然，如果葡萄糖、生物质或CO_2三个测量值中的任何一种被消除，仍有测量误差存在。只有消除了氧测量值后，检测函数值才降至一个低值，通过与自由度为1的χ^2分布值相比较，发现当置信水平大于90%时，还不能断定有过失测量误差存在。因此氧测量值很可能是误差来源。

若消除氧测量值，就有可能计算得到三个所测定速率的更好的估计值以及三个没测量速率（包括氧）的更好估计值。首先，通过用方程式（4.27），对于所测量的速率可得到：

$$\mathbf{r}_m=\begin{pmatrix}-r_s\\ \mu\\ r_c\end{pmatrix}=0.008\begin{pmatrix}-2.21\\ 0.98\\ 1.23\end{pmatrix} \tag{4}$$

此后用方程式（4.14）[对所测量的速率用方程式（4）代入] 可求出未测量的速率（氨吸收速率、水生成速率及氧吸收速率）为：

$$\hat{\mathbf{r}}_c=\begin{pmatrix}-r_N\\ r_w\\ -r_o\end{pmatrix}=0.008\begin{pmatrix}-0.17\\ 1.56\\ -1.18\end{pmatrix} \tag{5}$$

由此可见，氧吸收率得到大幅度校正。此外，利用估出的速率可得RQ为1.04，这是一个更加真实的值。

参 考 文 献

Abbott, B. J. & Clamen, A. (1973). A. The relationship of substrate, growth rate, and maintenance coefficients to single cell protein production. *Biotechnology and Bioengineering* **15**, 117-127.

Christensen, L. H. & Henriksen, C. M.; Nielsen, J. & Villadsen, J. (1995). Continuous cultivation of *Penicillium chrysogenum*. Growth on glucose and penicillin production. *Journal of Biotechnology* **42**, 95-107.

Erickson, L. E., Minkevich, I. G. & Eroshin, V. K. (1978). Application of mass and energy balance regularities in fermentation. *Biotechnology and Bioengineering* **20**: 1595-1621

Larsson, C., Blomberg, A. & Gustafsson, L. (1991). Use of microcalorimetric monitoring in establishing continuous energy balances and in continuous determinations of substrate and product concentrations of batch grown *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnology and Bioengineering*. **38**, 447-458.

Madron, F., Veverka, V. & Vanecek, V. (1977). Statistical analysis of material balance of a chemical reactor. *AIChE Journal* **23**, 482-486.

Nielsen, J. & Villadsen, J. (1994). *Bioreaction engineering principles*. New York: Plenum Press.

Roels, J. A. (1983). *Energetics and Kinetics in Biotechnology*. Amsterdam: Elsevier Biomedical Press.

Schulze, U. (1995). Anaerobic physiology of *Saccharomyces cerevisiae*. Ph. D. Thesis, Technical University of Denmark.

van der Heijden, R. T. J. M., Heijnen, J. J., Hellinga, C., Romein, B. & Luyben, K. Ch. A. M. (1994a). Linear constraint relations in biochemical reaction systems: Ⅰ. Classification of the calculability and the balanceability

of conversion rates. *Biotechnology and Bioengineering* **43**, 3-10.

van der Heijden, R. T. J. M., Heijnen, J. J., Hellinga, C., Romein, B. & Luyben, K. Ch. A. M. (1994b). Linear constraint relations in biochemical reaction systems: Ⅱ. Diagnosis and estimation of gross measurement errors. *Biotechnology and Bioengineering*. **43**, 11-20.

von Meyenburg, K. (1969). Katabolit-Repression und der Sprossungszyklus von *Saccharomyces cerevisiae*. Ph. D. Thesis, ETH Zürich.

von Stockar, U. & Birou, B. (1989). The heat generated by yeast cultures with a mixed metabolism in the transition between respiration and fermentation. *Biotechnology and Bioengineering*. **34**, 86-101.

Wang, N. S. & Stephanopoulos, G. (1983). Application of macroscopic balances to the identification of gross measurement errors. *Biotechnology and Bioengineering*. **25**, 2177-2208.

第 5 章　代谢途径的调控

在生物体中，生理功能的调控发生在细胞水平和分子水平上，这些调控是通过调节参加生化反应的各种物质的浓度来实现的。此类调控变量包括酶（E）、底物（S）、产物（P）及调节物分子（R）等的浓度，于是酶反应速率一般可表示为：

$$v = v(c_e, c_s, c_p, c_r)$$

在一个典型的细胞中上述物质分子大量存在，并且参与特定的相互作用。尽管其极其复杂，但生化系统仍可由它们达到稳定态的能力来表征，相信这是通常称作“控制”的分子特性间特定的相互作用的结果。代谢调控的研究试图阐明各个酶的活性被调节乃至在分子水平上被控制的机理（Atkinson，1970；Khoshland，1970；Khoshland 和 Neet，1968；Van Dam et al，1993）。一旦在局部水平理解了酶的调节特性，就可利用代谢控制分析结果推断途径通量的总体控制（见第 11 章）。

对某些途径，一个个反应是这样组织的以至于构成途径的代谢中间物总是结合到酶表面，而产物作为下一个反应的底物而依次传递（Hofmeyr，1991）。一个例子是脂酰辅酶 A 衍生物转化为乙酰辅酶 A 的 β-氧化途径。在这种情况下，中间代谢物通常参加一个特定的反应，而且在溶液中检测不到其存在。另一方面，一些代谢途径不是以这样的方式组织的，如 EMP 途径、葡萄糖异生、TCA 循环和磷酸戊糖（PP）途径等。这些途径的中间物尽管在细胞中浓度很低，但确实是可检测的。代谢的相互关联的性质需要一些化合物对多于一条途径起中间物和（或）前体物的作用（如：G6P，PEP，PYR，OAA）。这样的代谢物不能是酶结合物，因为它们必须是在多于一条途径中可利用的，并且更重要的是，这些途径的速率在不同条件下可能会变化。随着代谢性质开始阐明，理由就变得很明显：细胞利用一些代谢物用于代谢调控的目的，以致某些化合物既起代谢中间物的作用，又起关键酶的代谢调节物的作用。

导致细胞结构单元（如氨基酸、嘌呤和嘧啶核苷酸以及类固醇等）形成的生物合成反应序列源于简单的细胞材料，而这些材料产生于碳水化合物或脂肪酸的代谢（见第 2 章）。每条代谢途径与一个关键步骤发生联系，即生产第一个代谢中间物的反应注定了特定反应序列最终产物的生成。在多数情况下，该关键步骤是放能反应（即 $\Delta G^{0'}<0$，$K'>1$），以致该反应几乎是不可逆的。普遍认为企图调节最终产品生成的代谢控制在代谢节点处所起作用最满意，而中间步骤的控制不常用。

当被一个复杂的代谢网络所困惑时，一个重要问题是识别由不同中间反应所施加的相对控制。尽管代谢系统结构上及功能上的高度复杂性，但其表现了相当简单的动力学及独特的稳定态。这归因于酶的分层次的结构，特别是它们的时间尺度跨越 15 个数量级以上（de Koning 和 van Dam，1992；Heinrich 和 Sonntag，1982；Hiromi，1979）。在快的一边是代谢反应动力学（松弛时间 $10^{-2}\sim10^{4}$s），在最慢的一边是遗传调控及进化（参见 2.1 节及方框 2.1）。

表 5.1 概括了红细胞中糖酵解反应的松弛时间。基于这些数值，人们可以区分两组酶催化的反应。一组包括 HK，PFK，DPGM，DPGP，PK，ATP 酯酶，这些酶催化慢反应；

而其它反应的松弛时间要比这些反应快 2～6 个数量级。对这些快反应来说，底物与产物浓度基本上处于平衡状态，它们对整个代谢系统的动态响应相对来说是不重要的。换言之，系统的动态响应实质上能用慢反应来表示，这进而可相当大地减少需要考虑的变量数及整个体系的复杂性。

表 5.1 红细胞中糖酵解反应的松弛时间

酶 反 应	松弛时间/s	酶 反 应	松弛时间/s
己糖激酶(HK)	>1100	丙糖磷酸异构酶	约 10^{-2}
磷酸果糖激酶(PFK)	>75	磷酸甘油醛脱氢酶(GAPD)	约 10^{-2}
2,3-二磷酸甘油酸变位酶(DPGM)	4	磷酸甘油激酶(PGK)	约 10^{-2}
2,3-二磷酸甘油酸磷酸酯酶(DPGP)	34000	磷酸甘油变位酶(PGM)	约 10^{-2}
丙酮酸激酶(PK)	28	烯醇酶	约 10^{-2}
腺苷三磷酸酶(ATPase)	1800	乳酸脱氢酶(LDH)	约 10^{-2}
磷酸葡糖异构酶(PGI)	约 10^{-2}	腺苷酸激酶(AD)	约 10^{-2}
醛缩酶(Ald)	约 10^{-2}		

注：取自 Rappoport 等，1974；Schuster 等，1989。

不稳定性的概率随变量数而提高（见第 1 章）。因此，本质上时间层次可能是通过减少重要的动态变量而稳定代谢系统的一个重要因素。所以，尽管在微观水平上生物系统极其复杂，但代谢系统可用相对简单的表达式来成功地进行汇总及模型模拟。否则，对所有的实际目的，生物系统的理论分析都不会达到。

数目众多的代谢调控机理之间的一个基本区别，是它们直接调节细胞中存在的酶的活性(见方框 5.1)，还是需要改变特定蛋白质合成净速率的二次响应。活细胞使用过多的调控机制来调节酶活性。在极端范围，人们发现通过共价修饰可使酶完全失活或活化。对此，磷酸化是常见的机理，但也观察到添加或去掉腺苷酰基、乙酰基、甲基及其它部分基团时的作用。更常见的是通过与另一个分子（如反应产物）的可逆缔合而引起的酶活性逐渐变化。酶水平的控制可以取几种形式，包括酶合成和（或）其降解的调控。一般说来，高等植物或动物的分化细胞由于其特有的性质从而展现出很少且很小的酶水平调节。另一方面，细菌等单细胞生物体除酶活性调节外，则很强地依赖于酶水平的修饰以协调不同反应。

下面我们将回顾酶调控机理。5.1 节描述细胞中酶活性调控的不同模式，而 5.2 节则涉及发生在基因水平上实际酶浓度的调控。5.3 节和 5.4 节强调了在细胞水平上的调控问题：例如，细胞如何调控相关的酶反应组，以及最终系统的或整体的调控如何发生。

5.1 酶活性的调控

代谢调控的最为普通的形式是通过调节酶的活性水平而发生的。反馈抑制或激活是各种类型细胞中对调节酶活性的极端迅速的响应。酶合成的抑制或诱导（或消除抑制）代表缓慢而长期的调节机制，由此使细胞中特定酶的量得到优化。例如，从 20℃ 和 37℃ 下生长的大肠杆菌制得的细胞抽提物的 2-D 蛋白凝胶是没有区别的，尽管细胞做了非常大的调整以适应这两种生长温度下的生理差别（Ingraham，1987）。这样的调整必须主要通过改变酶的活性而不使酶浓度明显变化来达到。调整是由代谢物来促成的，该代谢物可以是一个反应序列的底物或产物，或者是总体的代谢物，例如 ATP 或 NAD（P）H。起调节作用的代谢物可以充当活化剂或抑制剂，它们通常分别被称为效应物或配位体。

方框 5.1　反馈抑制/激活模式（Neidhardt 等，1990）

在连续反馈抑制中，不同分支的调控被解耦，而且分支点代谢物充当途径中第一个酶的调节物。含有多个共同代谢物的更复杂的途径需要更复杂的控制方式，该控制方式可以将激活和抑制两者结合起来以协调代谢通量。这些调控方式在整个细菌界都可发现。

例如，同功酶的存在，或经一特定途径（或是顺序的或是分叉的）而有多个最终产物的生产，都需要本节所讨论的这些调控机制的结合。催化一个共同步骤中的第一个反应的同功酶通常对该途径的终端产物之一是敏感的。该机制（合作的或协助的抑制）保证终端产物抑制不会使细胞缺乏由相同代谢途径获得的代谢物。累积的（局部的）反馈抑制是前述机理的一种更复杂的调节形式，其中在一个单个酶上含有相应于该途径不同终端产品中每一个产品的多个别构位点（见图 5.1）。

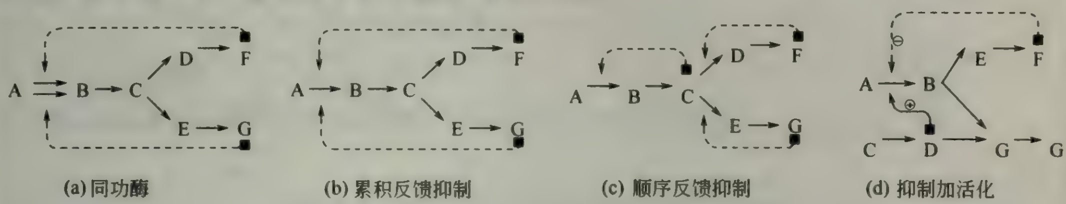


图 5.1　包括反馈抑制和激活的调控网络

5.1.1　酶动力学概述

Michaelis 和 Menten 最早尝试分析酶反应的动力学，他们的工作导致引入酶反应速率的两个基本动力学参数（Dixon 和 Webb，1979；Laidler 和 Bunting，1973；Schulz，1994；Segel，1993）。第一个参数 v_{max}称为最大反应速率，表示在给定的酶量下反应可达的最大速率，即酶被底物饱和时的反应速率。这是酶的催化效率的度量，而且直接与酶的转换数相关，该转换数定义为每秒钟底物分子转化成为产物的数目。转换数的范围从每秒几十万个分子（如碳酸酐酶转换数达 600000 s^{-1}）降到每秒少于一个分子（如溶菌酶为 0.5 s^{-1}）。

另一个重要的动力学参数是米氏常数 K_m，定义为反应速率为 $v_{max}/2$ 时的底物浓度。两参数的一个重要区别是 K_m 的值与酶浓度无关。K_m 值的重要性有以下几个原因：(1) 它提供了酶对其底物相对亲合性的一个有用指示（K_m 值越小，表示亲和性越高）；(2) 它确立了胞内底物水平的近似值，当 $c_s \gg K_m$ 时，没有生理意义，因为 v 会接近于 v_{max}，以及 v 会对 c_s 的变化不敏感，还有，当 $c_s \ll K_m$ 时，意味着 $v < v_{max}$，因此酶的催化活性的大部分会浪费掉；(3) 通过研究不同化合物对 K_m 的影响，有可能对某特定的酶识别出潜在的别构效应物；(4) K_m 值的有关知识能使酶分析中选择合适的底物浓度；(5) K_m表示一个特定酶的替代底物的相对适应性（具有最高的 v_{max}/K_m值的底物是最满意的）。

以 v_{max}和 K_m 为参数，反应速率与底物浓度间的关系如图 5.2 所示。其数学表达式如下：

$$v = \frac{v_{max} c_s}{K_m + c_s} \tag{5.1}$$

应当注意，尽管 Michaelis-Menten 方程最初是作为描述实验测量结果的经验式而提出的，但后来基于特定的分子机理得到证实。一种机理假定酶与底物先形成一个复合物（ES），然后复合物再进一步分解为产物（P）和游离酶（E）：

$$E + S \underset{}{\overset{k_1,\ k_{-1}}{\longleftrightarrow}} (ES) \xrightarrow{k_2} E + P \tag{5.2}$$

酶-底物复合物生成步骤的平衡假定允许我们由式（5.2）的反应机理导出反应速率式（5.1）。后来证明“平衡假说”是不正确的，酶-底物复合物不是处于稳态。然而，酶-底物复合物（ES）的拟稳态假说推出与式（5.1）同样的速率式，虽然速率常数 K_m 现在是与式（5.2）的速率常数 k_1，k_{-1}和 k_2 不同的函数（推导见方框 5.2）。

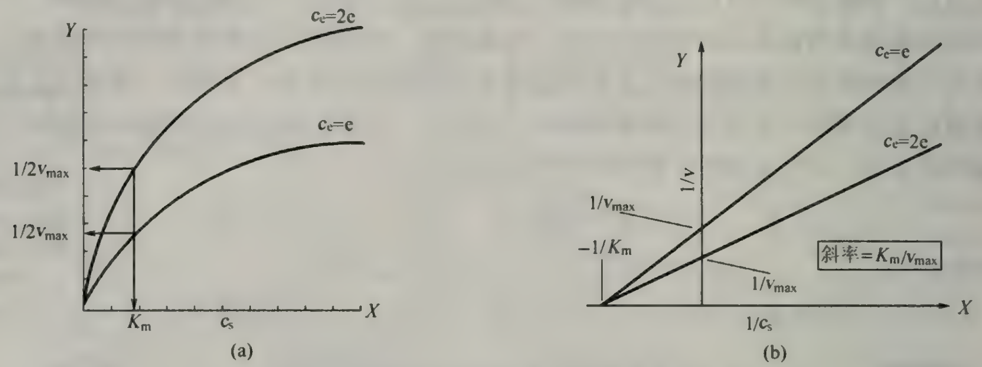


图 5.2　不同酶浓度时的速率-底物浓度关系曲线

（a）酶浓度分别为 c_e=e 和 c_e=2e 时的速率-底物浓度曲线；

（b）通常应用双倒数法（$1/v$ 对 $1/c_s$）即 Lineweaver-Burk 法来确定 v_{max}和 K_m 值

注意 v_{max}是一个宏观性质，其随着 c_e而改变，而 K_m是一个本征值，与 c_e 无关

Lineweaver 与 Burk 将上等式转换为线性形式，以使 K_m 值和 v_{max}值能被更准确地确定。

$$\frac{1}{v} = \frac{1}{v_{max}} + \left(\frac{K_m}{v_{max}}\right)\frac{1}{c_s} \tag{5.3}$$

因此，由 $1/v$ 对 $1/c_s$作图，就可得到一条直线，其斜率为 K_m/v_{max}，Y 轴截距（即 $1/c_s=0$ 时）为 $1/v_{max}$，而 X 轴截距（即 $1/v=0$ 时）为 $-1/K_m$，[见图 5.2（b)]。

方框 5.2　方程式（5.1）的推导

最简单的酶反应是由单一底物（S）经由一种中间复合物（ES）转化为单一产物（P）的过程。通常称作单-单反应体系，可表示如下：

$$E + S \overset{k_1,\ k_{-1}}{\longleftrightarrow} (ES) \xrightarrow{k_p} E + P$$

速率方程式（5.1）可由下面两种方法分别推出，（1）快速平衡法；（2）稳态（或 Briggs 和 Haldane）法。

（1）快速平衡法

顾名思义，该简单方法假定快速平衡条件成立，即：与 ES 转化成 E + P 的反应相比，E、S 及 ES 非常迅速达到平衡。因此，瞬时速率仅取决于 ES 的浓度：

$$v = k_p c_{es} \tag{1}$$

这里 k_p 称为催化速率常数。所有的酶分布于 E 和 ES 之间，即：

$$c_{et} = c_e + c_{es} \tag{2}$$

式（1）除以式（2）得

$$\frac{v}{c_{et}} = \frac{k_p c_{es}}{c_e + c_{es}} \tag{3}$$

根据快速平衡假定，c_{es}可由 c_s，c_e及 K_s 表示，K_s 是 ES 复合物的解离常数：

$$K_s=\frac{c_e c_s}{c_{es}}=\frac{k_{-1}}{k_1} \qquad \text{因此，} \qquad c_{es}=\frac{c_s}{K_s}c_e \tag{4}$$

将式 c_{es}表达式（4）代入式（3）：

$$\frac{v}{c_{et}}=\frac{k_p\dfrac{c_s c_e}{K_s}}{c_e+\dfrac{c_s c_e}{K_s}}$$

将 k_p 移到等式左边，并同时消去 c_e：

$$\frac{v}{k_p c_{et}}=\frac{\dfrac{c_s}{K_s}}{1+\dfrac{c_s}{K_s}} \qquad \text{令} \quad k_p c_{et}=v_{max}\text{，推出}\frac{v}{v_{max}}=\frac{\dfrac{c_s}{K_s}}{1+\dfrac{c_s}{K_s}} \tag{5}$$

式（5）重排可得更熟悉的 Henri-Michaelis-Menten 方程式：

$$\frac{v}{v_{max}}=\frac{c_s}{K_s+c_s} \tag{6}$$

这样，该式给出了在任何底物浓度下，瞬时速率或初始速率 v 相对于 v_{max}的变化关系。重要的是要记住该式成立的条件：只有在足够短的时间里进行 v 的测量，以致 c_s 基本上保持恒定，或换言之，在分析期间，不超过约 5%的底物将被利用。

（2）稳态法（Briggs 和 Haldane 法）（Haldane，1965；Walter，1965）

如果我们假定 ES 转化为产物的速率比 ES 解离成为 E+S 的速率要快，那么 E 与 S 混合后不久，将建立一个稳态，这时 ES 的浓度将不随时间而改变。通过如下程序（其类似于第 1 部分快速平衡的情况），基于稳态假定，可推导出速率方程。类似于前面的推导：

$$\mathrm{E+S}\xrightleftharpoons{k_1,\ k_{-1}}\mathrm{(ES)}\xrightarrow{k_2}\mathrm{E+P}$$

$$v=k_p c_{es} \tag{7}$$

$$\frac{v}{c_{et}}=\frac{k_p c_{es}}{c_e+c_{es}} \tag{8}$$

因为假定 c_{es}不随时间而改变，其形成速率与分解速率相等

$$k_1 c_e c_s=k_{-1}c_{es}+k_p c_{es}=(k_{-1}+k_p)c_{es}\text{推出 } c_{es}=\frac{k_1 c_e c_s}{(k_{-1}+k_p)} \tag{9}$$

定义

$$K_m=\frac{(k_{-1}+k_p)}{k_1}\text{推出 } c_{es}=\frac{c_s c_{et}}{K_m+c_s} \tag{10}$$

将式(10)代入式(7)整理后得：

$$\frac{v}{v_{max}}=\frac{c_s}{K_m+c_s} \tag{11}$$

这样，两种情况所得的速率方程形式一样，但速率常数不同［式（6）中 K_s 与式（11）中 K_m 不同］。注意，当 $k_p \ll k_{-1}$时，K_m 可简化为 K_s。K_m（或 K_s）的物理意义是当酶反应速率达最大反应速率一半时的底物浓度，即当 $c_s=K_m$ 时：

$$v=\left(\frac{K_m v_{max}}{K_m+K_m}\right)=\frac{1}{2}v_{max} \tag{12}$$

5.1.2 简单可逆抑制系统

任何降低酶反应速率的分子被当作是抑制剂。已知许多自然存在的和合成的物质干扰酶的活性，这些作用或者是可逆的，或者是不可逆的（Webb，1963）。本节概括了只有一种底物和一种抑制剂时可逆抑制的四种基本类型：即底物抑制，竞争性抑制，非竞争性抑制和反竞争性抑制。

底物抑制

在很多情况下，当有大量底物存在时，酶反应由于底物过量而受到负面影响。正如图5.3所显示的，当底物浓度增加时，反应速率达到一个最大值。之后，底物浓度的增加引起酶反应速率下降。

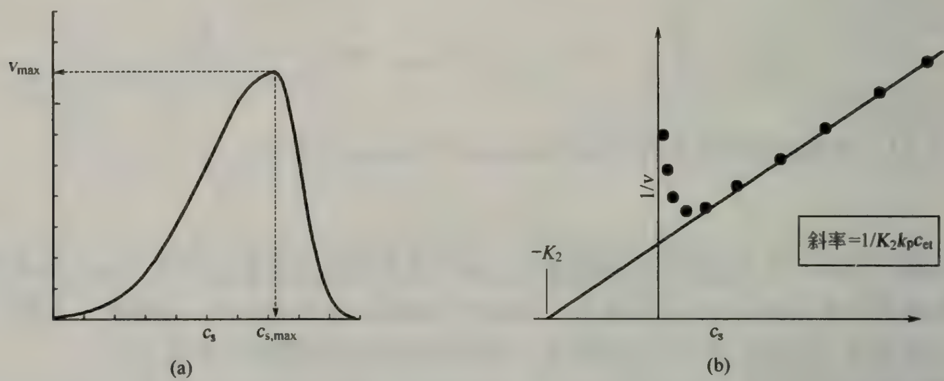


图 5.3 底物抑制

(a) 在底物水平大于 $c_{s,max}$后，底物浓度增加导致酶反应速率下降；

(b) 以 $1/v$ 对c_s 作图，可确定 K_2 值（参见正文）

由快速平衡法（方框 5.2）可以推导一个模型。假设底物 S 与复合物 ES 结合成一个非反应的中间物 ES_2，达平衡时：

$$E + S \overset{k_1,\ k_{-1}}{\longleftrightarrow} ES \qquad （解离常数\quad K_1 = k_{-1}/k_1）$$

$$ES + S \longleftrightarrow ES_2 \qquad （解离常数\quad K_2）$$

$$ES \xrightarrow{k_p} E + P \qquad （慢反应步骤）$$

根据方框 5.2 的分析，速率方程为：

$$v = \frac{k_p c_{et}}{1 + K_1/c_s + c_s/K_2}$$

如图 5.3 所示，由实验数据以 $1/v$ 对c_s 作图，由所得直线与 X 轴的交点可求得 $-K_2$，进而 K_1 可由下式求出：

$$c_{s,max} = \sqrt{K_1 K_2}$$

注：当 $c_s = c_{s,max}$时，$dv/dt = 0$。

竞争性抑制

竞争性抑制剂是一种分子，其与底物之一具有共同的特征，因而使之能与该底物竞争可利用的酶活性中心。反应产物、不可代谢的底物类似物、底物衍生物及替代底物都可作为竞

争性抑制剂。丙二酸是众所周知的琥珀酸脱氢酶的竞争性抑制剂，琥珀酸脱氢酶催化琥珀酸氧化反应生成延胡索酸［succinate（琥珀酸）+ FAD ⇌ fumarate（延胡索酸）+ $FADH_2$］。如图 5.4 所示，由丙二酸、戊二酸和草酸引起的琥珀酸脱氧酶的竞争性抑制主要是由于它们与主要底物琥珀酸的结构类似性。由果糖及甘露糖抑制的己糖激酶催化的葡萄糖与 ATP 的反应，是另一个由替代底物引起的竞争性抑制的例子。

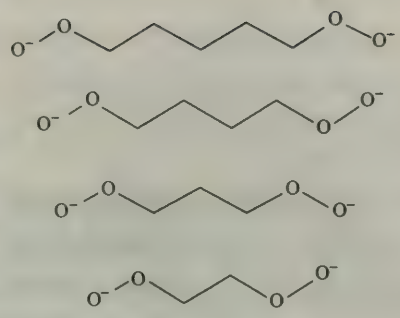


图 5.4　底物（琥珀酸）与琥珀酸脱氢酶的竞争性抑制剂之间的结构类似性

由于抑制剂与酶的结合是可逆的，于是在游离酶分子与结合了抑制剂的酶抑制剂复合物分子之间就建立了一个平衡，如图 5.5 中反应方程式所示。由此反应机理可推出竞争性抑制反应速率为：

$$\frac{1}{v}=\frac{K_m}{v_{max}}\left(1+\frac{c_i}{K_i}\right)\frac{1}{c_s}+\frac{1}{v_{max}} \tag{5.4}$$

一个竞争性抑制剂只是起了线性地增加了底物的表观米氏常数的作用［$K_{m,app}=K_m(1+c_i/K_i)$］，而 v_{max}保持不变。式中抑制参数 K_i 的数值相当于使双倒数图直线斜率加倍时的抑制剂浓度，但并不等于发生 50% 抑制时的抑制剂浓度。因为在相对于 c_i 而言的低底物浓度下，活性中心更可能被抑制剂占据，反之亦然。故可通过增加 c_s 提高反应速率，用非常高的底物浓度克服抑制，因为在这些条件下，酶遇到抑制剂分子的概率变小了。

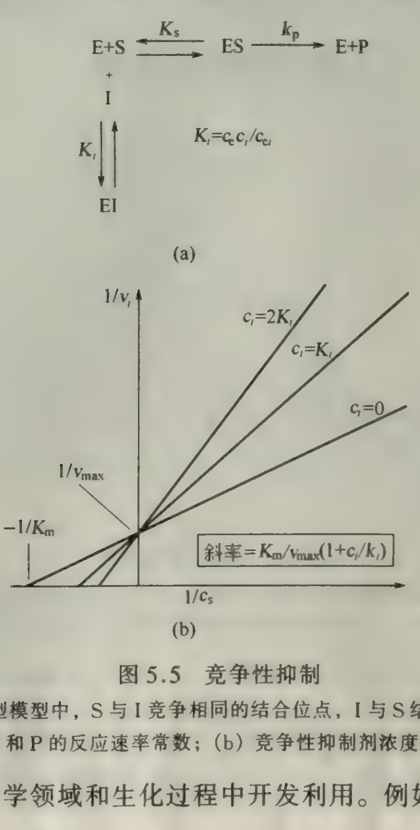


图 5.5　竞争性抑制

（a）反应图解，在典型模型中，S 与 I 竞争相同的结合位点，I 与 S 结构相似，$K_i=c_e c_i/c_{ei}$，$K_s=c_e c_s/c_{es}$，k_p 是 ES 分解为 E 和 P 的反应速率常数；（b）竞争性抑制剂浓度不同（0，K_i，$2K_i$）时的双倒数图

竞争性抑制原理已在医学领域和生化过程中开发利用。例如，像磺胺这样的药物是基于

它们的结构与细菌关键底物结构类似而设计的。磺胺非常类似于对胺基苯甲酸的结构，是细菌用来作为合成叶酸的前体物。于是被细菌感染的病人可通过此药物得到有效的治疗，因磺胺药物通过相应细菌酶的竞争性抑制阻止了叶酸的合成，这对人类没有任何有害影响（人体不存在叶酸合成途径）。

非竞争性抑制

这类抑制剂与酶的结合也是非共价的、可逆的。这些抑制剂结合到酶分子的同源调节位点（离开活性位点）并触发酶的构型改变，从而干扰酶的催化效率。非竞争性抑制剂对底物的结合没有影响，而且与其竞争对手形成对比，S 与 I 随机地、独立地在酶的不同位点结合。这样的抑制在稳态多反应物系中普遍存在。非竞争性抑制机理及对应的双倒数图如图 5.6 所示。图中表示，I 能与 E 及 ES 结合，S 能与 E 及 EI 结合。酶与一个配基的结合对另一个的解离常数没有影响，但是所生成的 ESI 复合物是无活性的。

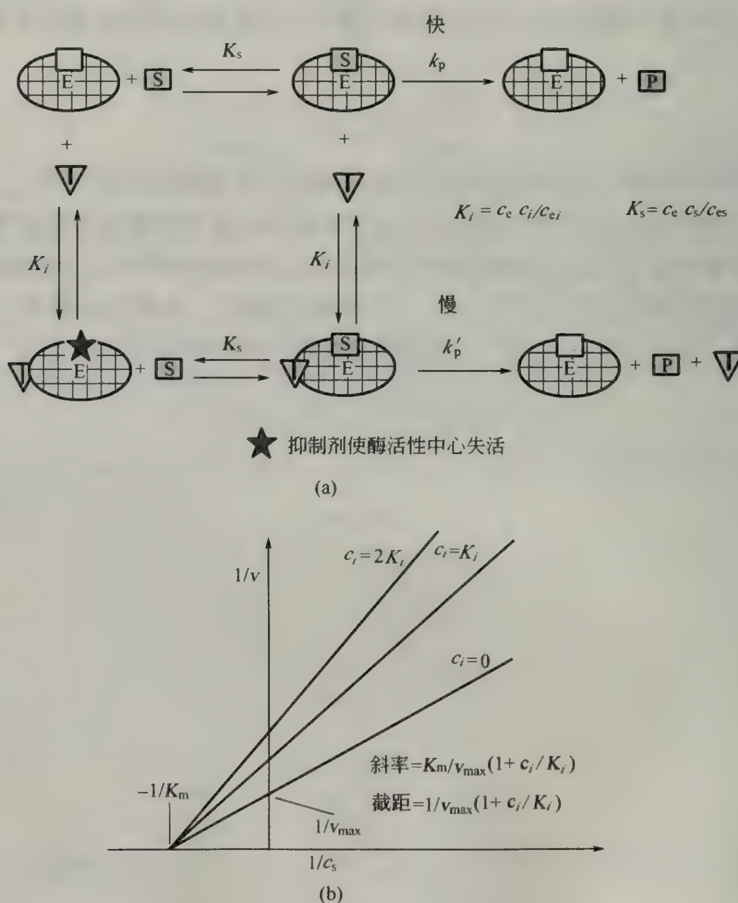


图 5.6 非竞争性抑制

(a) 抑制剂和底物可逆地、随机地、独立地在不同位点结合；(b) 非竞争性抑制剂在不同固定浓度（0，K_i，$2K_i$）下的 $1/v$-$1/c_s$ 图。一个典型的非竞争性抑制剂使 v_{max} 降低，但不影响 K_m 值

非竞争性抑制存在时，v，v_{max}，c_s，K_m，c_i 和 K_i 间的关系式可由快速平衡假定推出：

$$\frac{1}{v}=\frac{K_m}{v_{max}}\left(1+\frac{c_i}{K_i}\right)\frac{1}{c_s}+\frac{1}{v_{max}}\left(1+\frac{c_i}{K_i}\right) \tag{5.5}$$

式（5.5）表明在通常的 $1/v$ 对 $1/c_s$ 图中直线斜率和在 Y 轴上的截距均为 c_i 的函数。

机理上，这是由于非竞争性抑制对底物结合及催化效率二者的双重影响。如图 5.6 所示，由于 Y 轴截距和斜率均以相同的因子（$1+c_i/K_i$）增加，而 X 轴截距保持不变，并等于 $-1/K_m$。正如所预见的，非竞争性抑制剂的惟一影响是减小 v_{max} 而 K_m 保持不变。重要的是要注意到：k_p 也没改变，而正是由于部分 ES 转变为非反应的 ESI 形式使 ES 的稳态浓度实际上减小了。

因为非竞争性抑制剂通常不类似于任何特定底物，故一种单一类型的抑制剂往往能够影响范围很广的酶类。例如，螯合剂（如 EDTA 和氰化物分别结合镁和铁）就属于此类抑制剂。由于含铁蛋白质在氧化还原反应中具重要作用，而对所有含 ATP 的反应中都需要镁离子，故这类抑制剂可能会产生有害的生理影响。

反竞争性抑制

反竞争性抑制剂是这样的分子，它可逆地结合到酶-底物复合物，并形成一个无活性的 ESI 复合物。这类抑制普遍存在于多反应物系统，如图 5.7 所示。根据通常的平衡假定可得出如下速率方程：

$$\frac{1}{v}=\frac{K_m}{v_{max}}\times\frac{1}{c_s}+\frac{1}{v_{max}}\left(1+\frac{c_i}{K_i}\right) \tag{5.6}$$

反竞争性抑制剂使 v_{max} 和表观 K_m 都以相同因子降低 [$v_{max,i}=v_{max}/(1+c_i/K_i)$，$K_{m,app}=K_m/(1+c_i/K_i)$]。$K_m$ 的减小产生于反应 $ES+I \rightleftharpoons ESI$，该反应使 ES 数量减少，引起 $E+S \rightleftharpoons ES$ 的平衡向右移动。反竞争性抑制的反应平衡式与双倒数图如图 5.7 所示。当 c_i 增加时，Y 轴截距也增加，形成一系列平行线。

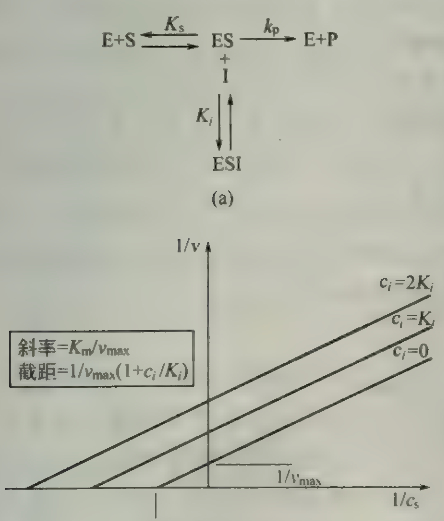


图 5.7 反竞争性抑制

(a) 反应图解，典型的反竞争性抑制剂可逆地与酶-底物复合物结合，产生无活性的 ESI 复合物；(b) 双倒数图表明，斜率仍为 K_m/v_{max}，而 $1/v$ 轴截距随因子（$1+c_i/K_i$）而增大，这样增加抑制剂浓度可产生一系列平行线，其 Y 轴截距随抑制剂浓度增加而增大

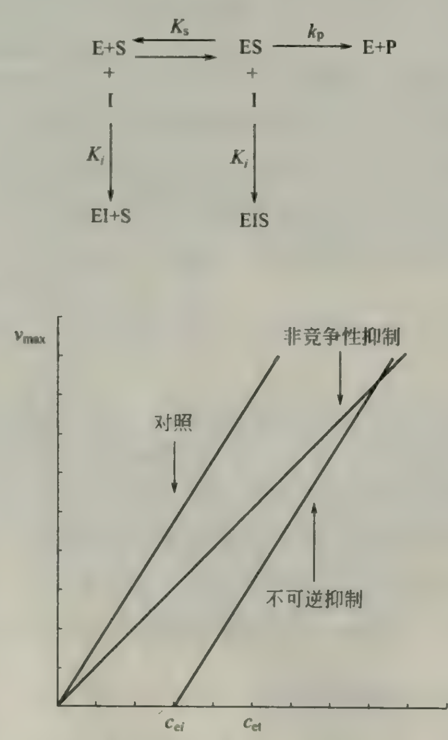


图 5.8 不可逆抑制与非竞争性抑制的比较

c_{et} 代表由不可逆抑制剂所滴定的酶的数量

5.1.3 不可逆抑制

不可逆抑制剂是这样的分子，它与酶分子共价结合并永久地破坏了酶的催化活性。一个典型的不可逆抑制剂是二异丙基磷酸氟化物（DIPF），它与丝氨酸部分的羟基结合而使酶失活。在其它情况下，不可逆抑制剂是极具选择性的，如抗生素青霉素，它有选择性地抑制参与细胞壁合成的酶。因为 v_{max}被减小了，使酶不可逆失活的物质可能被曲解为非竞争性抑制剂。不可逆抑制剂和可逆的非竞争性抑制剂可通过 v_{max}对 c_{et}作图来区分（c_{et}是用于试验的酶活性总的浓度）。如图 5.8 所示，对一个可逆的非竞争性抑制剂来说，“附加的抑制剂”直线比对照直线斜率要小，且两条直线都经过原点。另一方法，对不可逆抑制剂而言，“附加的抑制剂”直线的斜率与对照直线斜率相同，但与 X 轴相交于数值等于不可逆失活酶浓度 c_{ei}的位置。

【例 5.1】 通过调节酶活性控制生物合成网络；天冬氨酸氨基酸途径中的反馈控制结构（Umbarger，1978）

氨基酸中天冬氨酸族成员（赖氨酸、蛋氨酸、苏氨酸和异亮氨酸）是通过图 5.9 所示的分支途径生产的。通常，这类分支途径的调控很复杂，因为它需一种结构以使得一种产品过量时不会意外地关掉整个途径。例如，在大肠杆菌中这种特殊途径的调节机制确实是非常复杂的，因为这些机制还包括了同功酶的参与。如图 5.9 所示，每种产物都抑制和（或）阻遏共同途径中的第一个酶——天冬氨酸激酶。然而，为使一种产物不能阻遏所有激酶的活性，存在着天冬氨酸激酶的三种不同的同功酶（指催化同一化学反应的不同的酶）：一个对 L-赖

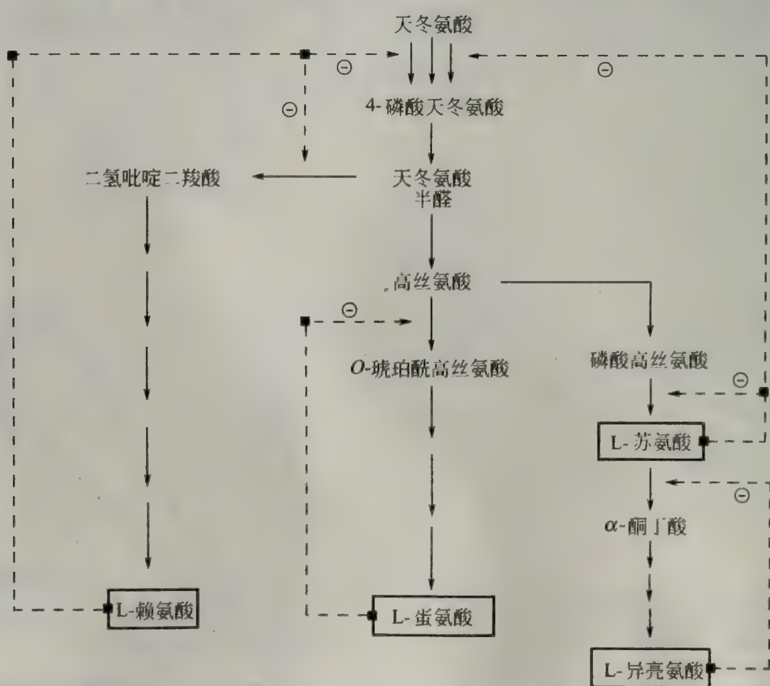


图 5.9 肠道细菌氨基酸的天冬氨酸族的调控

L-赖氨酸抑制天冬氨酸激酶Ⅲ和二氢甲基吡啶合成酶；L-蛋氨酸抑制 O-琥珀酰高丝氨酸合成酶；L-苏氨酸抑制天冬氨酸激酶Ⅰ和高丝氨酸脱氢酶；L-异亮氨酸抑制苏氨酸脱氧酶

氨酸抑制敏感，一个对苏氨酸抑制敏感，一个主要受过量的蛋氨酸阻遏。另外，大肠杆菌还能够调节存在着途径产物混合物不平衡的情况。例如：蛋氨酸过量而其它产物（赖氨酸、异亮氨酸和苏氨酸）水平低不能通过单独调节天冬氨酸激酶来校正，因为这不会产生蛋氨酸与其它三种氨基酸的适当比例。因此，每种氨基酸通常调控自己的特定分支途径的第一个酶。蛋氨酸和异亮氨酸通过反馈抑制和阻遏机制两种方式来调节代谢途径，而赖氨酸和苏氨酸参与更复杂的调控类型。

很幸运，对于代谢工程目的，众多的微生物具有更加简单的调节机制，也许是因为这些微生物在它们的环境中不常遇到组成不平衡的氨基酸混合物。如果一个生物体通常生活在氨基酸贫乏的环境中，那么氨基酸生物合成的主要调节功能是调整其速率以适应于微生物的生长速率。分支途径的主要调节功能可通过只有一个或一些产品抑制第一酶的系统来实现。在氨基酸生产菌中的土壤细菌谷氨酸棒杆菌和“棒状菌株群”的其它成员中确实已发现这种类型的简单调控系统。短杆菌属-棒杆菌属菌群中调控系统的简易性，使得仅通过简易地分离营养缺陷型突变株或调节突变株，就可利用这些菌株大量生产赖氨酸成为可能。

在这些突变株中，催化一个代谢物生物合成步骤的酶活性已被破坏。营养缺陷型突变株需要在其培养基中补充所说的代谢物以利生长。例如，高丝氨酸脱氢酶（HDH，催化天冬氨酸半醛转化为高丝氨酸的酶）缺失的突变株是高丝氨酸或苏氨酸和蛋氨酸营养缺陷型。这种谷氨酸棒杆菌营养缺陷型大量产生赖氨酸而不产生任何一种其它氨基酸，有两个原因：(1) 由于 HDH 酶破坏，所有天冬氨酸激酶的通量都转到赖氨酸的形成；(2) 赖氨酸与苏氨酸混合物约 $1mmol \cdot L^{-1}$时，对天冬氨酸激酶的抑制接近 94%，而仅单独有约 $1mmol \cdot L^{-1}$赖氨酸时，其对此酶的抑制很勉强（仅达 12%～20%）。由于这样的突变株需要对其生长培养基精确补充蛋氨酸和苏氨酸，故调节突变株对赖氨酸的商业生产更有用。

通常，利用赖氨酸类似物 *S*-氨乙基半胱氨酸（AEC），已经获得改变了赖氨酸生物合成调控的棒杆菌属突变株。像赖氨酸一样，该类似物可抑制天冬氨酸激酶的活性，从而也抑制野生型菌株的生长。另一方面，AEC-抗性突变株似乎使其天冬氨酸激酶有了改变，以致该酶改变了的别构调控位点对 AEC 也对赖氨酸的亲和力较低。这些突变株的酶可能以低的亲和力与赖氨酸结合而且在通过赖氨酸的反馈调控中是有缺点的。通过一系列调控突变株的选择，目前商业生产上可应用的菌株产赖氨酸量超过 60g/L。

5.1.4 别构酶

上节介绍的酶具有多个但相互独立的底物结合位点，即一个分子的结合并不影响空位点原有的结合或解离作用。第二类完全不同的调节酶包括这样的酶，它与一个分子的结合引起结构的或电子的变化，结果导致酶的剩余空位亲和力发生了改变。这种相互作用可以或是同促的，即仅包括底物（简单协同性）；或是异促的，即这种相互作用包括底物与抑制剂或底物与激活剂分子。这组酶更通俗地被称为别构酶，它通常是由许多亚基组成并且由 S 形速率曲线来表征（Harford 与 Weitzman，1975；Kurganov，1982；Monod 等，1963；Sanwal，1969，1970；Stadtman，1966）。

在控制途径通量中，与遵循 Michealis-Menten（M-M）动力学、满足双曲线响应的酶相比，别构酶动力学具有明显的优点。别构酶这种 S 形动力学曲线表明：在低 c_s 时，c_s 小的变化促使酶变得更有效。当 c_s 增加时，正协同性使酶活性比通常情况提高得更快，而负协同性使酶活性比通常增加得更慢。协同性在生理上是重要的，因为它提供了酶对底物水平

波动或别构调节水平波动的敏感性变化的程度。因此，S形响应本质上在低或高浓度时分别起“关-开”的开关作用。而在中等浓度时，S形响应提供了反应速率更加敏感的控制。这种调节的另一个重要性质是存在着一个浓度阈值，低于该阈值就没有催化活性。这种阈值现象在激素响应、神经信号或细胞分化等情况下极端重要。

“别构”这一术语最早被 Monod，Changeux 和 Jacob 在给酶分类时使用，这些酶在与底物没有结构类似的分子存在时改变了动力学特征（通常是 K_m 值）(Monod 等，1963)。其后又扩大到包括由于底物或效应物分子结合而以不同构形存在的酶。

这种响应在代谢控制中是极其重要的。例如，在一串联的酶反应步骤中，细胞可以通过终产物对第一步反馈抑制的开-关作用来调节此途径的通量。这就能确保一条避免细胞结构单元过量生成和积累的经济路线。别构酶的通用重要特性概括如下。

- 它们是由多肽亚基聚集而成的多聚体酶复合物构成的。典型的别构酶由 2、4、6 或更多个亚基组成。这些亚基可以不同，其中一种亚基具有催化功能而其它的具有调节功能；或是完全相同，同样的亚基具有催化和调节两种功能。
- 效应物和底物通常具有非常不同的化学结构，并在不同位点与酶结合（调节位点对催化位点）。
- 通常认为别构效应物是通过修饰酶的构形状态的方式以使其活性可以增加或降低。这意味着酶可以不同的构形存在，故称为别构酶。配基的结合引起变化，或者通过使酶从一种构形变化到另一种构形，或者通过改变两种构形之间的平衡。在两种情况下，都会使酶从不太活泼状态转变到更活泼状态，因此效应物能够调节其活性。
- 别构酶的一个明显特征是其动力学性质偏离 M-M 动力学：v 对 c_s 作图呈 S 形曲线而不是 M-M 双曲线。由于大多数别构酶呈现 S 形动力学，别构性已成为 S 形响应的同义词。然而严格地说，这并不确切，因为并非所有的 S 形曲线都产生于别构作用。例如一个随机的双反应物反应系统（两个底物或底物加效应物），这里有一个比三元复合物更合适的动力学途径会产生一个类似的响应。

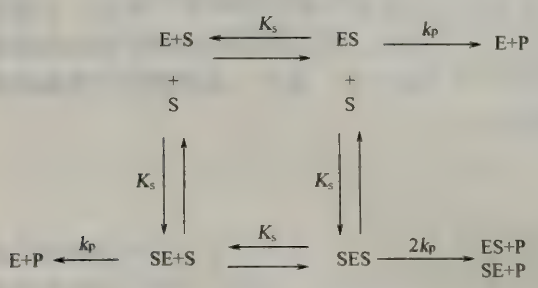


图 5.10 非协同作用的二聚酶的底物结合序列
二聚体（两个位点）模型中两个位点是相同的而且是互相独立的，K_s 称为本征解离常数

非协同位点

作为对别构性的介绍，让我们考虑二聚酶的情况，该酶的两个位点相同，并且互相独立，如图 5.10 所示。对这样一个机理，速率方程由下式给出

$$\frac{v}{v_{max}}=\frac{\dfrac{c_s}{K_s}+\dfrac{c_s^2}{K_s^2}}{1+\dfrac{2c_s}{K_s}+\dfrac{c_s^2}{K_s^2}}=\frac{\dfrac{c_s}{K_s}\left(1+\dfrac{c_s}{K_s}\right)}{\left(1+\dfrac{c_s}{K_s}\right)^2} \tag{5.7}$$

其中
$$K_s=\frac{c_s c_e}{c_{es}},\quad v_{max}=2k_p c_{et}$$

通常，对具有 n 个相同且相互独立位点的酶，其速率方程可表示为

$$\frac{v}{v_{max}}=\frac{\dfrac{c_s}{K_s}\left(1+\dfrac{c_s}{K_s}\right)^{n-1}}{\left(1+\dfrac{c_s}{K_s}\right)^n}$$

或者

$$\frac{v}{v_{\max}}=\frac{c_s}{K_s+c_s} \tag{5.8}$$

由此可见，不考虑 n 值，v 对 c_s 作图总是双曲形的，因此不可能由动力学数据来确定 n。换句话说，不可能区分具有 n 个相同位点的 1mol 酶和具有 1 个位点的 $n$mol 酶。

协同结合

另一方面，协同相互作用的实质是一个底物分子的结合引起结构的和/或电子的变化，从而影响空位点上的结合特性。在这类酶中，第一个分子的结合通过增强空的结合位点对底物分子的亲和力从而能促进另外的分子的结合。这种现象也称为正协同效应或正促响应，意味着它包括一类结合分子，即底物。包括不同配基对（如：底物和激活剂，底物和抑制剂，抑制剂和激活剂）的相互作用称为异促响应，它可以是正异促响应，也可以是负异促响应。

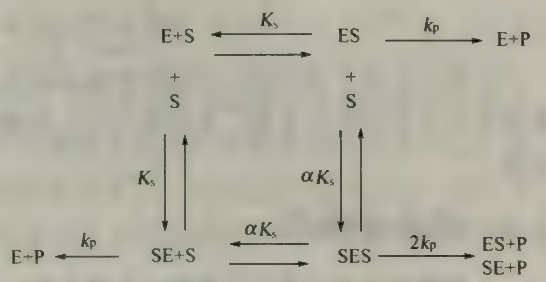


图 5.11　具有双结合位点的别构酶的底物结合序列
在一个底物位点的结合（导致 ES）可改变本征解离常数 K_s 为 αK_s，$\alpha<1$

让我们再次考虑具有两个位点的酶，但此时第一分子的结合将影响第二个结合。如图 5.11 所示，此时第二个空位点的解离常数变为 αK_s（这里，$\alpha<1$ 为正协同效应，而 $\alpha>1$ 为负协同效应）。

该机理产生如下反应速率动力学表达式（5.9）。与非协同情况不同，式（5.9）不能简化为简单的 M-M 方程，相应于 c_s 其展现出特有的 S 形特征。

$$\frac{v}{v_{\max}}=\frac{\dfrac{c_s}{K_s}+\dfrac{c_s^2}{\alpha K_s^2}}{1+\dfrac{2c_s}{K_s}+\dfrac{c_s^2}{\alpha K_s^2}} \tag{5.9}$$

其中

$$K_s=\frac{c_s c_e}{c_{es}},\ v_{\max}=2k_p c_{et}$$

对更复杂的四聚体，速率方程变为

$$\frac{v}{v_{\max}}=\frac{\dfrac{c_s}{K_s}+\dfrac{3c_s^2}{\alpha K_s^2}+\dfrac{3c_s^3}{\alpha^2\beta K_s^3}+\dfrac{c_s^4}{\alpha^3\beta^2\gamma K_s^4}}{1+\dfrac{4c_s}{K_s}+\dfrac{6c_s^2}{\alpha K_s^2}+\dfrac{4c_s^3}{\alpha^2\beta K_s^3}+\dfrac{c_s^4}{\alpha^3\beta^2\gamma K_s^4}} \tag{5.10}$$

注意：在这个模型中，影响是渐进的和累积的，即第二个分子的结合使剩下两个位点的解离常数以 β 到 $\alpha\beta K_s$ 的因子发生改变，而第三个分子的结合使最后一个位点的解离常数以 γ 到 $\alpha\beta\gamma K_s$ 的因子发生改变。

Hill 方程——别构酶简化的速率方程

对于呈现显著协同效应的酶，其因子 α、β、γ 等都非常小，因此，速率方程主要取决于 $(c_s)^n$ 项(即：对于 $c_s>K_s$ 的任何情况，含有少于 n 个分子底物的所有酶-底物复合物的浓度将可忽略不计)。例如，4 个位点酶的速率方程此时可简化为

$$\frac{v}{v_{\max}}=\frac{\dfrac{c_s^4}{\alpha^3\beta^2\gamma K_s^4}}{1+\dfrac{c_s^4}{\alpha^3\beta^2\gamma K_s^4}}=\frac{\dfrac{c_s^4}{K'}}{1+\dfrac{c_s^4}{K'}}=\frac{c_s^4}{c_s^4+K'} \tag{5.11}$$

对具有 n 个相当的底物结合位点的酶，已提出如下动力学方程（Hill 方程）：

$$\frac{v}{v_{\max}}=\frac{c_s^n}{K'+c_s^n} \tag{5.12}$$

式中，$K'=\alpha^{n-1}\beta^{n-2}\gamma^{n-3}\cdots K_s^n$。式（5.12）中的常数 K' 相当于 $v=0.5v_{\max}$ 时底物浓度的 n 次幂（即：c_s^n）。它包含本征解离常数 K_s，还有相互作用因子（<1 为正协同作用；>1为负协同作用）。

Hill 方程式（5.12）可写成更有用的形式：

$$\lg\left(\frac{v}{v_{\max}-v}\right)=n_{\text{app}}\lg c_s-\lg K' \tag{5.13}$$

这样，上式左边对$\lg(c_s)$ 作图可得斜率为 n_{app}的直线。如果协同性不高，那么 n 的计算值将小于实际的位点数，具有高于 n_{app}的最接近的高整数值，而 n_{app}代表最小的实际位点数。

5.2 酶浓度调节

上节我们讨论了酶活性调节的不同方式。这些机制担负修饰细胞中已存在的酶分子的速率，它们包括可逆或不可逆反应，这些反应实质上影响总的可利用分子中活性酶分子的数量。结果，这些调节机制在极短的特征时间里迅速作出反应。当然，能够修饰一个酶反应速率的一个替代的方法是通过改变酶的总量。因为酶是基因表达过程的产物，其数量实质上可在两种水平上控制：DNA 转录和 RNA 翻译。大多数处于调控中的原核生物是在转录水平上控制的，这防止了不必要的 mRNA 生产浪费。

5.2.1 转录起始的控制

当 RNA 聚合酶与编码基因上端的启动子区域相结合时，转录起始发生（见方框 5.3）。调控转录最明显的地方会在基因的启动子区域或其附近。通过控制 RNA 聚合酶与启动子结合的速率，细胞能够调节 mRNA 产生的数量，最终决定所合成酶的水平。与包括在该控制中的实际编码区（结构基因）相邻的序列称为调节区。该区除了启动子外，还包括一个能与调节分子相结合的操纵基因区。调节蛋白或可阻止转录（负调控）或可增加转录（正调控）(Hoopes 和 McClure，1987)。

操纵子是指由共同调节区控制的依次排列的几个不同基因。从一个操纵子形成的mRNA包含着构成操纵子（多顺反子）全部结构基因的信息。它用于通常参与在一个共同生化途径中的所有基因产物的协调控制。

方框 5.3　细菌启动子

启动子是 DNA 片段，通常位于某些基因的上游，RNA 聚合酶在此与其结合以起始 mRNA 的合成。通过不同的方式可对细菌启动子的活性水平进行调控。正调控是研究得最多的机理之一，它包括一种激活剂在启动子的 -35 区附近的结合。一种研究得非常充分的激活剂是 cAMP 结合蛋白（CAP），它是一种别构蛋白，在结合 cAMP 后构形发生改变。有些蛋白激活剂的活性也能通过共价修饰来调节，例如 NR_1 蛋白被磷酸化后，能够激活 Ntr（氮-调节）启动子的转录。正调控的第二种方式包括不同的 σ 因子与 RNA 聚合酶全酶的结合。利用这类调控的启动子含有特征序列（通常在 -10 区），而且认为转录调节是通过在相关 σ 因子的细胞水平上的变化而发生的。

下调转录起始的机理也很常见。一个基本机制包括阻遏物与操纵区的结合以降低启动子的活性。阻遏物分子的结合区位点是变化的，范围包括从启动子-35区的上游到-10区的下游。一些大肠杆菌操纵子（*gal*，*deo* 和 *ara*）有两个互相独立的抑制剂结合位点。与激活剂一样，阻遏物也是别构蛋白，在与它们的同源性配体结合后构形发生变化，而共价修饰是不常见的。其它尚未很好理解的负调控类型包括启动子区 DNA 甲基化和超卷曲等。自体调控是另一种有趣的调节机制。据此，基因调控通过基因自身产物来实现。这类控制遵从酶反应反馈抑制的主题，提供了一个反馈机制，通过该机制阻遏物或激活剂能够防止自身的过量生产。典型的例子包括如下基因：*crp*（碳代谢全局调控）、*ara*C(L-阿拉伯糖操纵子调节基因)、*trp*R（Trp 生物合成操纵子的阻遏物）和 *gln*G（氮同化作用调节基因）。图 5.13 给出了从大肠杆菌及其噬菌体中所选的部分启动子，并简述了其一般特征。通过对 100 多个大肠杆菌启动子的检测显示出 Pribnow 框（mRNA 起始位点左侧的 5～10 个碱基）出现的频率如下：$T_{80}A_{95}T_{45}A_{60}A_{50}T_{96}$。这个区域的功能被认为是使 RNA 聚合酶定向，以致合成从左向右进行，同时这也是双螺旋打开的地方。

启动子区域的进一步检验表明：大多数启动子在 Pribnow 框的左侧都存在另外一个重要的保守序列。这个 6 碱基序列（其被称为-35 序列并且有共同的 TTGACA 序列）被认为是 RNA 聚合酶结合的初始位点。弱启动子与强启动子之间的区别在于-35 区和-10区的序列。

在真核细胞中，启动子序列随所包括的 RNA 聚合酶的类型而变化。由 RNA 聚合酶Ⅱ转录的编码蛋白质基因的启动子通常含有共同序列 TATAAA，它位于转录起始位点上游约 30 个碱基处。这个序列被称为 TATA 框，大约 80%的 RNA 聚合酶Ⅱ转录基因都含有这个序列。该序列类似于原核细胞基因-10 区，在 RNA 聚合酶Ⅱ定位中起关键作用，而且它的去除会完全破坏转录起始。除了 TATA 框外（或而不是 TATA 框），有 10%～15%的由 RNA 聚合酶Ⅱ转录的基因含有两类其它控制序列，它们通常位于转录起始位点上游的 60～120 碱基处：一种有共同序列 CCAAT（CCAAT 框），另一种为 GGGCG（GC 框）。

个别操纵子——乳糖操纵子（*lac* operon）

最早最充分表征的操纵子之一是乳糖操纵子（Müller-Hill，1996）。这个操纵子的完全调控十分复杂。尽管如此，我们在这节对其性能仅提供一个相当基础的叙述。乳糖操纵子带有利用乳糖作为碳源时所必需的结构基因，如图 5.12 所示。乳糖是由葡萄糖和半乳糖构成的双糖，是该操纵子的主要调节分子❶。乳糖操纵子的启动子和操纵区分别是 *lacP* 和 *lacO*。*lacI* 基因编码阻遏蛋白，当缺乏乳糖时，阻遏蛋白与操纵区结合，因此完全阻碍 RNA 聚合酶与启动子的结合。在乳糖存在的条件下，乳糖操纵子的表达被诱导。乳糖（诱导物）在阻遏物分子特定位点的结合，引起阻遏蛋白发生变构，降低了它与乳糖操纵子 DNA 结合的亲和力。因此，RNA 聚合酶就能够发挥其转录多顺反子 mRNA 的功能，而多顺反子 mRNA 编码 *β*-半

❶ 更确切地说，调节分子是乳糖的异构体，异乳糖，它充当诱导物。这种物质是通过 *β*-半乳糖苷酶原位把乳糖转化为异乳糖而形成的。因此，实际上处于 *lac* 操纵子控制的 *β*-半乳糖苷酶还必须以基本水平进行组成型表达以作为诱导序列的引子。

乳糖苷酶（*lacZ*），乳糖通透酶（*lacY*）和 β-半乳糖苷转乙酰基酶（*lacA*）。与典型的操纵子一样，这些基因产物分担相关的功能。通透酶确保乳糖进入细胞，而 β-半乳糖苷酶打开乳糖的 β-1,4 糖苷键，释放出游离的单糖。因此，乳糖操纵子是一个负调控诱导系统。

乳糖操纵子还有一个另外的正调控系统。正调控的目的是防止过量葡萄糖存在时产生能量浪费。因为大肠杆菌利用葡萄糖的酶是组成型的，所以当葡萄糖与乳糖同时存在时，生产乳糖代谢酶对细胞是没有意义的。例如，当大肠杆菌利用葡萄糖生长时，胞内环腺苷酸（cAMP）水平是低的，而利用其它碳源生长时，cAMP 的水平趋向于增高。可以认为，cAMP 为乳糖操纵子提供了正调控信号。当 cAMP 处于高水平（表明缺乏葡萄糖）时，其能够与一种特定蛋白（CAP，降解物激活蛋白）结合，生成的 CAP-cAMP 复合物将进而结合于乳糖操纵子上的 CAP 结合位点。结果发现促进了更下游的 DNA 螺旋失去稳定，这进而促进 RNA 聚合酶的结合，因此提高启动子的效率。

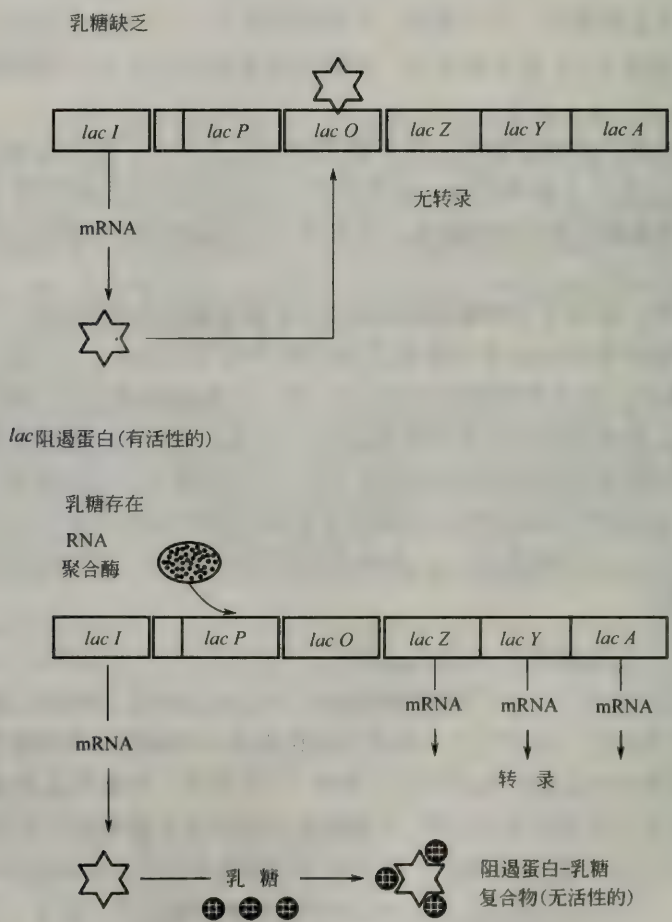


图 5.12　乳糖操纵子的转录控制

乳糖缺乏时（上图），乳糖阻遏物与乳糖操纵子 DNA 结合，阻断 RNA 聚合酶对 *lac* 基因的转录。乳糖存在时（下图），其结合到乳糖阻遏物，形成一个不能与乳糖操纵子结合的无活性复合物。这样就允许 RNA 聚合酶与启动子区结合，并转录编码乳糖操纵子三个酶的基因 mRNAs，这三个酶是：β-半乳糖苷酶（*lacZ*）、通透酶（*lacY*）和 β-半乳糖苷转乙酰基酶（*lacA*）

转录一旦开始就继续进行下去，直到 RNA 聚合酶遇到一段 DNA 终止序列（富含 GC

的序列之后由 RNA 上的一连串 U 残基跟随），或者中止的 RNA 聚合酶面临于转录终止剂分子，如 Rho 因子。尽管这种事件一般都发生在操纵子末端，但是在某些情况下它们能提前发生，因此作为一种调节功能。例如：在新合成的 mRNA 中发卡环的形成，引起 RNA 聚合酶的中止，有 80%～90% 的时间会导致酶从转录泡囊排出，而终止 mRNA 的延长。这种调控转录终止的机制被称为“弱化作用”，其通过转录和翻译之间的一种特定的偶联来运行。这类调控的一个典型例子是大肠杆菌色氨酸操纵子。当色氨酸（更确切地说是色氨酸-tRNA）的供应水平较低时，*trp* 转录产物开始附近的初期终止环不能形成，而 *trp* mRNA 被完整转录。相反，高水平的色氨酸触发弱化作用机制，从而使色氨酸生物合成基因的合成终止。

CG**TATAAT**GTGTGGA
GG**TACGAT**GTACCACA
AG**TAAGAT**ACAAATCG
GTG**ATAAT**GGTTGCA
CT**TATAAT**GGTTACA
CG**TATGTT**GTGTGGA

图 5.13　大肠杆菌及其噬菌体的启动子片段
加粗的字母表示共同序列（Pribnow 框），单下划线表示“保守 T”，双下划线表示 mRNA 合成的起始位点

5.2.2　翻译的控制

某些酶的遗传控制也能够发生在翻译水平，被称为转录后调控。这种调控机制控制着一个完整的 mRNA 分子被翻译的次数。已阐明的第一个系统是被噬菌体 R17 感染的大肠杆菌中一种酶的产生。R17 只编码三种基因产物——两种结构蛋白和该酶的复制酶。因为噬菌体需要大量的外壳蛋白，mRNA 分子在外壳蛋白基因的终止密码与复制酶基因的 AUG 密码之间有一个外壳蛋白的结合位点。当合成外壳蛋白时，该位点逐渐被蛋白分子充满，阻塞了核糖体对复制酶的翻译。当包装病毒粒子所需的外壳粒子被全部合成以后，其被释放出来以形成一个新的病毒并使复制酶翻译接着发生。一般情况下，翻译调节可以通过调控如下措施之一来进行：(1)mRNA稳定性；(2)翻译起始概率；(3)蛋白质合成的总速率(Iserentant 和 Fiers，1980；Stormo 等，1982)。

许多编码核糖体蛋白的操纵子都是在翻译水平上进行调控的。所有细菌的生长速率都随其生长培养基组成而变化。以葡萄糖为碳源的基本培养基中，在 37℃ 下大肠杆菌大约 45min 分裂一次，而较差碳源例如脯氨酸为碳源，则需要约 500min。在含有葡萄糖、氨基酸、嘌呤、嘧啶、维生素和脂肪酸的营养丰富培养基中，细胞不必合成这些基本单元，因此生长极为迅速，世代时间低于 30min。因为核糖体对蛋白质的合成能力是有限的（37℃ 下每秒钟约 15 个氨基酸），所以在不同的比生长速率下（因而，也有不同的蛋白质合成速率），每个细胞的核糖体数目也随之变化。例如，以倍增时间为 25min 生长的大肠杆菌每个细胞含有 70000 个核糖体，当以倍增时间为 300min 生长时，每个细胞只含有 2000 个核糖体。进一步的“向下变换”实验（即：把细菌细胞从营养丰富培养基转移到基本培养基）表明，每个细胞的核糖体含量通过暂停 rRNA 的合成而相应地减少。

在不同生长速率下，rRNA 与核糖体和 r-蛋白质与核糖体的恒定比例可通过两种反馈机制来调节：第一种，核糖体被少许地过量合成而且游离的非翻译状态的核糖体抑制 rRNA 的合成（核糖体反馈调节）；第二种，某些 r-蛋白质抑制编码一种或多种 r-蛋白质的 mRNA 的翻译（翻译抑制）。研究表明，翻译抑制是一个特殊的 r-蛋白质与核糖体结合位点附近的一个碱基序列结合的结果。另一方面，当翻译抑制不发生时，每个 mRNA 都被完全翻译，结果产生由特定 mRNA 编码的每个 r-蛋白质的数目相等。这种机制确保 r-蛋白质以相同速率合成并与核糖体的合成相耦联。

另一种重要的 rRNA 调节系统是所谓的严紧响应。某个培养物在生长过程中，如果一种生长培养一种氨基酸被耗尽，就会导致形成空载 tRNA，进而触发 *relA* 基因的诱导。

relA 基因的产物是一种被称为严紧因子的蛋白质（仅存在于核糖体 50S 亚单位），其负责 ppGpp 的生产。ppGpp 的生产发出停止蛋白质合成的信号（因为氨基酸缺乏），进而触发 rRNA 合成的终止。

【例 5.2】 遗传调控网络：胆固醇合成与消除（Hardie，1992；Ku，1996）

包括改变了基因表达的典型病例是高胆固醇血症，其表现为高胆固醇水平。像冠状血管病、肥胖症、糖尿病等慢性疾病，都存在影响途径中特定基因表达的代谢成分。胆固醇主要以极低密度脂蛋白（VLDL）的形式进入血液，VLDL 是在肝脏和小肠中形成的。虽然胆固醇合成需要几种酶，但认为 3-羟基-3 甲基戊二酰辅酶 A（HMG-CoA）还原酶是生理条件下的控制酶。降低胆固醇水平的药物之一是阻遏 HMG-CH 还原酶的一类抑制剂。胆固醇生物合成途径及其主要的反馈机制如图 5.14 所示。

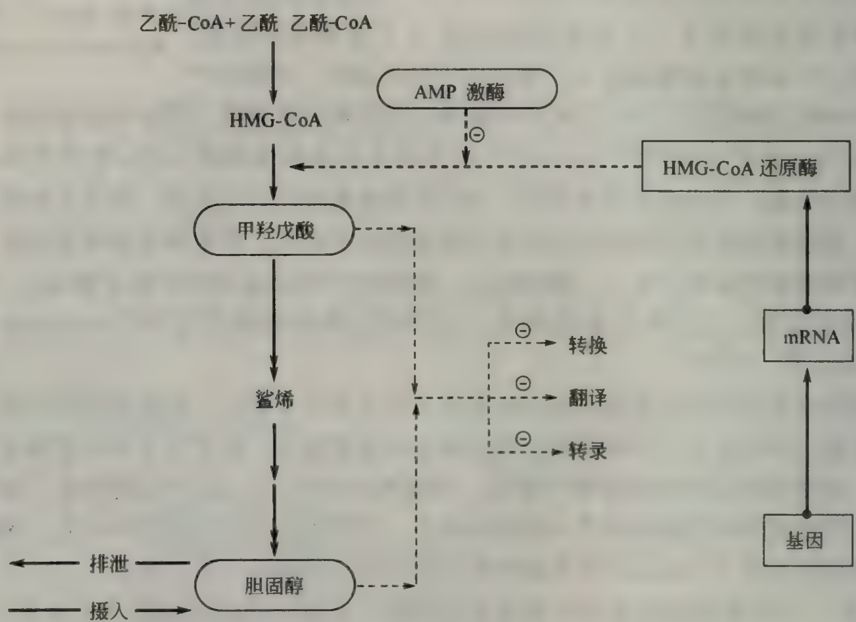


图 5.14 胆固醇生物合成途径及其调控

甲羟戊酸对 HMG-CoA 还原酶在两个不同水平上施加负调控。甲羟戊酸或一种相关代谢物可使编码 HMG-CoA 还原酶的 mRNA 的翻译速率降低 5 倍之多，与此同时它也增加 HMG-CoA 还原酶的降解速率。两种效应都导致 HMG-CoA 还原酶水平减少，以保护细胞抵抗该途径中间代谢物毒性水平的累积。已经发现升高胆固醇水平抑制该基因的转录达 8 倍之多。这些负反馈回路对 HMG-CoA 还原酶的浓度产生 200 倍范围内的动态变化。对这条途径更远的负调控是由抑制作用施加的，该抑制作用产生于一个依赖 AMP 的蛋白激酶对 HMG-CoA 还原酶的磷酸化。

5.3 总体调控：在完整细胞水平上的调控

大约 30 年前，乳糖操纵子作为一个基因调控详例的阐明激起了人们研究其它操纵子的

强烈兴趣。这些努力导致很多新操纵子的发现。对这些操纵子系统的研究和分析得出共识：这些操纵子不是独立起作用，而是作为一个高水平调控网络的成员发挥作用（Neidhardt et al，1990）。这类总体调控是生物体性能构成整体所必需的部分，该性能是生物体维持在不同的和变化着的环境中生长的能力。例如：从富营养培养基变换到基本培养基、改变碳源、氨基酸限制、好氧和厌氧环境间的变换（仅对兼性微生物）、热休克以及磷酸盐、氮源和碳源极度匮乏。

总体控制是指细胞利用调控信号控制细胞多种生理状态的能力，这些生理状态产生于前一段所提到的对任何一种环境变化的协调响应。这样的调控网络包括功能明显无关而且在染色体图上的物理位置也不连续的多套操纵子和多套调节子。在一个总体调控网络中，各组操纵子都被统一协调控制，尽管它们在物理上分布于整个细菌基因组并且有时表现出完全不同的功能。总体调节子定义为在一个总体调节网络中处于一个共同调节蛋白控制下的一个操纵子网络。然而，即使简单的环境变化通常都会诱导几个调节子。因此，刺激子用以指相应于单一环境刺激的全部调节子。为强调总体调节网络的复杂关系和重叠性质，引人术语调控代谢子（modulon），其定义为通过共享一个多效调节蛋白处于不同的特定控制之下的一组操纵子和（或）调节子。近年来已经变得很明显：整体调控是原核生物界的共同主题。

这种整体调控网络的存在至少有两个理由（见图 5.15）。第一，某些细胞过程所涉及的基因多于一个单个操纵子所能容纳的基因。以细菌的翻译机器为例，其涉及至少 150 个基因产物的一组基因，包括：rRNA，核糖体蛋白，起始、延长及终止因子，氨酰基-tRNA 合成酶和 tRNAs。如此为数众多的相互关联组分的协调控制对细胞生长的总效率是很重要的，然而，将所有这些基因包含在一个操纵子内几乎是不可能的。第二，尽管有些基因需要被独立调控，但有更高级的协调控制系统也是至关重要的。这些情况的例子常见于编码分解代谢

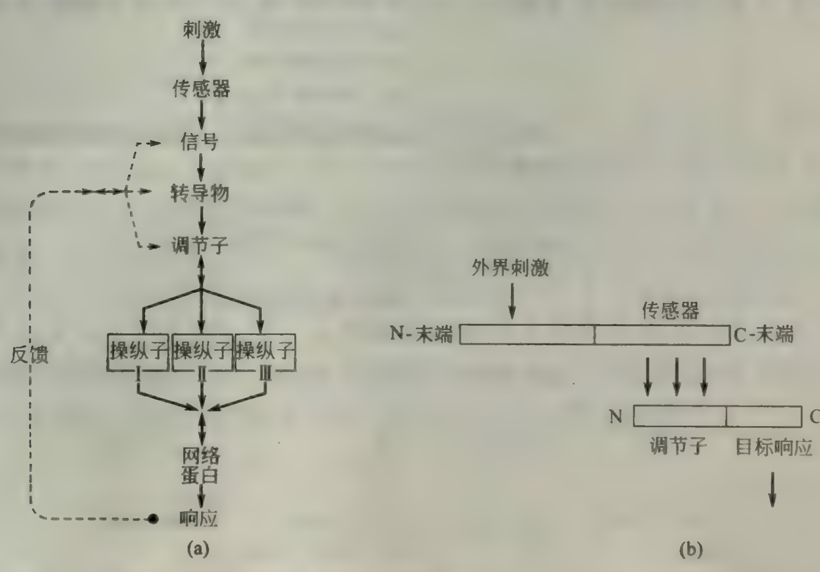


图 5.15　总体调控

(a) 响应于环境条件（如温度、pH、营养状态）所产生的信号直接或间接地（通过一个或多个转导物）控制调节分子（调节器）的合成速率。随后，调节器控制成员操纵子的蛋白质合成速率，这些蛋白质的功能会促进生长或给予细胞生存的能力。一个反馈控制机制容许系统回到一个新的平衡状态。(b) 传感器与调节器之间的信号转导。保守区域用类似的阴影（十字形）表示

酶的基因中，而这些酶参与碳源和能源的利用。葡萄糖是大多数细菌的优质底物，当存在于生长培养基时，它总是抑制第二种或冗余底物的代谢所需酶的表达（分解代谢抑制）。然而当缺乏优质底物时，每个操纵子都必须有在其同源底物存在时独立诱导的能力。这些例子表明需要一个调控组织机构替代单个操纵子的独立调控。

据估计，细菌细胞已演化形成了几百个多基因系统，其中至今没有几个已被深入研究。表 5.2 给出一些来自各种细菌的例子，按照细胞对营养限制、氧化还原变化及不利环境条件的响应以三大类条目整理列出。很显然，细菌已演变形成了各种各样的总体调控机理，对这些机理刚刚开始进行阐述。毫不意外，这种调控网络的许多组成部分是借用于操纵子的调节系统，例如蛋白阻遏物、激活物或 σ 因子。热休克和孢子形成系统利用 σ 因子为 RNA 聚合酶重新编制程序，以便让它识别成员操纵子的启动子。SOS、氧化损伤和厌氧电子传递系统利用蛋白阻遏物/激活物，以识别为组成型操纵子调控区所共用的一段特定序列。另一方面，作为最普遍最难理解的操纵子之一的严紧控制系统，其没有明显的蛋白调节剂，而是利用核苷酸鸟苷四磷酸（ppGpp）作为总体调节分子。

表 5.2　细菌多基因调节系统

刺　激	系　统	生　物	调节基因	被调节基因
营养限制				
碳	分解代谢阻遏	肠细菌	*crp*：编码激活剂 *cya*：腺苷酸环化酶	*lac*，*mal*，*gal*，*ara*，*tna*，*dsd*，*hut* 等分解代谢所含基因
氨基酸或 ATP	严紧反应	肠或其它细菌	*RelA* 或 *SpoT*：编码(p)ppGpp 代谢的酶系	核糖体及蛋白翻译和生物合成酶基因(>200)
氮	Ntr 系统	肠细菌	*GlnB*：蛋白质 P_{II} *glnD*：UR/UT 酶 *glnG*：蛋白质 NR_I *glnL*：蛋白质 NR_{II}	*glnA*，*hut* 等
氮	Nif 系统	克雷伯(氏)杆菌属、产气菌等	包括调控氮的多基因	编码固氮酶的多基因
磷	Pho 系统	肠细菌	*PhoB*：PhoB 的活性调节子 *PhoU*：磷转运的传感器	*PhoA* 及其它
饥饿	孢子形成	枯草芽孢杆菌	*SpoOA*：激活剂 *SpoOF*：调节子	控制孢子形成的基因(>100)
饥饿或抑制	稳定期	所有细菌	未知	上百个基因
能量代谢				
供氧	Arc 系统（需氧）	大肠杆菌	*ArcA*：阻遏蛋白 *ArcB*：ArcA 的活性调节子	需氧代谢
非 O_2 电子受体	厌氧呼吸	大肠杆菌	*fnr*：编码激活剂	硝酸还原酶和厌氧呼吸酶系的基因
电子受体缺失	发酵	大肠杆菌及其它兼性菌	未知	发酵酶系基因(>20)

刺　激	系　统	生　物	调节基因	被调节基因
应激				
紫外或其它 DNA 损伤	SOS 反应	大肠杆菌及其它菌	*LexA*：阻遏蛋白 *recA*：LexA 活性调节子	约 20 个修复紫外损伤的 DNA 的基因
DNA 烷化	Ada 系统	大肠杆菌及其它菌	*Ada*：激活剂	去掉 DNA 上烷基的四个基因
H_2O_2 或类似氧化剂	氧化反应	肠细菌	*OxyR*：阻遏蛋白	约 12 个氧化防护基因
升高温度	热刺激	大肠杆菌及其它菌	*HtpR* σ^{32}	约 20 个用于大分子合成、加工与降解的基因
降低温度	冷刺激	大肠杆菌	未知	一些用于大分子合成的基因
高渗透	(膜)孔蛋白反应	大肠杆菌及其它菌	*EnvZ*：传感器 *ompR*：DNA 结合蛋白	(膜)孔蛋白基因

注：摘自 Neidhardt，1987；Neidhardt et al，1990。

多基因系统的一个重要方面是处理信息的能力，这是常由蛋白质-蛋白质相互作用来执行的一种功能。细菌对环境刺激响应的遗传及生化分析表明，响应于这种刺激的信号转导常常是通过两类蛋白质对之间的通讯而发生的。每对蛋白都由传感器蛋白和调节器蛋白组成，传感器蛋白能够检测环境的变化进而将信号传送到与其合作的调节器蛋白。随后受感应的调节器蛋白将影响（正面地或负面地）某些操纵子组的转录起始。每类信号转导蛋白成员之间已观察到相当大的同源性。在多数情况下，传感器蛋白 C-末端的保守区域延伸到超过 250 个氨基酸，而调节蛋白 N-末端的保守区域延伸到超过 120 个氨基酸［见图 5.15（b）］。

磷酸化作用的信号转导

到 20 世纪 80 年代中期，已很清楚许多多基因系统含有一个蛋白质对，其组成分别属于两种蛋白质家族（Wanner，1992）。在一个典型的传感器-调节器两组分调节系统中，跨膜结构域把传感器蛋白分成周质空间域，周质空间域感受特定的环境刺激，随后诱导其 C-末端自动磷酸化［比较图 5.15（b）］。在第二步中，磷酸基团被传递到相应调节器的 N-末端。第一个蛋白质家族的成员是蛋白激酶（PKs），它能够将 ATP 的磷酸基团转移到该激酶的组氨酸残基而被磷酸化。在第二步，这些磷酰基基团又被转移到称为磷酸化响应调节器（PRRs）的第二个蛋白质家族成员的天冬氨酸残基上。最后一步，该磷酰基基团可以通过水解作用从 PRR-磷酸天冬氨酸残基上除去。整个磷酸化过程可归纳如下

$$\text{ATP} + \text{PK-His} \longrightarrow \text{ADP} + \text{PK-His-}\mathbf{P}$$

$$\text{PK-His-}\mathbf{P} + \text{PRR-Asp} \longrightarrow \text{PK-His} + \text{PRR-Asp-}\mathbf{P}$$

$$\text{PRR-His-}\mathbf{P} \longrightarrow \text{PRR-Asp} + \mathbf{P}_i$$

在一个典型的细菌中，估计可能存在 50 种这样的转导系统。已经发现通过磷酸化作用产生信号在细菌界广泛存在，调控着诸如基因表达的调控、趋药性（chemotaxis）或发育途径等各种各样的调控功能（见表 5.3）。组氨酸蛋白激酶家族成员具有保守的羧基末端，而响应调节器蛋白则在氨基末端附近具有大约 100 个氨基酸残基的保守序列。这种保守序列的重要意义在于，在一些情况下，可以允许不同系统之间的相互作用（对话）。例如：在

PhoR 突变株中（即带有已破坏的 *PhoR* 基因的细胞，因此，缺乏 *PhoR* 活性），*PhoM* 基因的产物（显然是另一种PK）在对 *PhoB*（RRP）的修饰中可部分替代有缺陷的 *PhoR* 。

表 5.3　同源磷酸基转移酶的例子

系　统	蛋白激酶	响应调节子	系　统	蛋白激酶	响应调节子
氮调节子(Ntr)	NR_{II}	NR_{I}	(膜)孔蛋白调节子(Omp)	EnvZ	OmpR
磷调节子(Pho)	PhoR	PhoB			
需氧呼吸(Arc)	ArcB	ArcA	孢子形成(Spo)	SpoIIJ	SpoOA/SpoOF

注：摘自 Neidhardt et al，1990。

作为这种对话的结果，一种适应性响应的活化作用可容许细胞通过交叉磷酸化而部分地激活一个同源系统。

对于真核细胞的基因调控，磷酸化作用是一种更可取的调控机制。存在于哺乳动物细胞质中的蛋白磷酸酶已被分成为两种类型。第一类磷酸酶能够被纳摩尔浓度的两种热稳定性蛋白（称为抑制剂 1 和抑制剂 2）所抑制，而且这两种蛋白能够优先使磷酸化酶激酶的 β-亚基脱磷酸。另一方面，第二种类蛋白磷酸酶不受抑制剂 1 和抑制剂 2 的影响，能够优先使磷酸化酶激酶的 α-亚基脱磷酸。各种蛋白激酶已被证实是磷酸化酶，它们在哺乳动物的骨骼肌和肝脏中，参与糖原分解、糖原合成、糖酵解、糖原异生、芳香族氨基酸降解、脂肪酸合成、胆固醇的合成及蛋白质的合成过程的调节作用。

尽管在调控网络中蛋白质-蛋白质相互作用是非常重要的，但是不同操纵子组被协调的方式是多种多样的。例如，大肠杆菌对热休克的响应是被 RNA 聚合酶的一种 σ^{32}因子在细胞内的水平所控制，σ^{32}水平的升高会诱导一组约 20 个基因。能够诱导大约 20 个 DNA 修补蛋白的 SOS 系统，它是通过成员操纵子阻遏物的蛋白质分解破裂所诱导的。在另一种机制中，一组基因（约含 12 个）被氧化损伤所诱导，诱导作用是通过正调节器 OxyR 的活化而促成的。

【例 5.3】　交叉调控：Pho 调节子

交叉调控在中心碳代谢途径的控制中可能特别重要。交叉调控最著名的例子是大肠杆菌的磷酸（Pho）调节子（Lee et al，1990；shin 和 Seo，1990；Wanner 和 wilmes-Tiesenberg，1992)。该调节子包括 *PhoA* 基因（编码细菌碱性磷酸酶，BAP)、编码磷源降解和吸收用酶的几个其它基因。胞外 P_i 是细胞生长的优先磷源，并通过 PstSCAB 系统被吸收结合。然后胞内 P_i 在中心代谢途径中经过几条不同的途径形成 ATP（见图 5.16)。

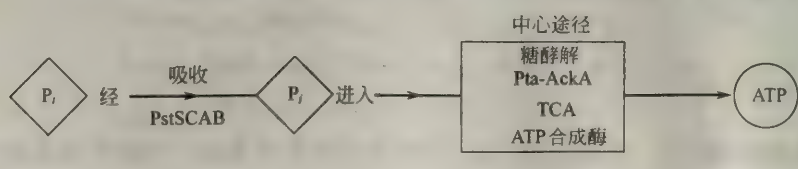


图 5.16　P_i 吸收与同化为 ATP

P_i 分别经糖酵解途径中的 3-磷酸甘油醛脱氢酶和磷酸甘油酸激酶、经磷酸转乙酰基酶和乙酸激酶（Pta-AckA)、经有氧生长条件下 TCA 循环中的琥珀酰辅酶 A 合成酶或经 F_1F_0-ATP 合成酶作用形成 ATP

作用于 Pho 调节子的 3 种控制方式如图 5.17 所示，其中两种包括交叉调控。一种控制利用传感器 CreC，由葡萄糖所诱导。第二种控制是通过丙酮酸上的生长而诱导。后一种调控方式或许是探测乙酰磷酸的水平并激活 *PhoB*，该激活过程通过一种未知的传感器或直接由乙酰磷酸或通过磷酸激酶来完成。因此，Pho 调节子的控制经由乙酰磷酸与 Pta-AckA 途径相联系。在葡萄糖上生长时，乙酰磷酸由 Pta 产生并被 AckA 进一步利用，对于在乙酸或丙酮酸培养基上生长，情况也确实是这样。已经证明，在丙酮酸、前体物，或乙酰辅酶 A 存在条件下，Pho 调节子被诱导。此外，在 *pta* 和 *ack* 缺失突变菌株内，经由乙酰磷酸的调控机制则被完全破坏。

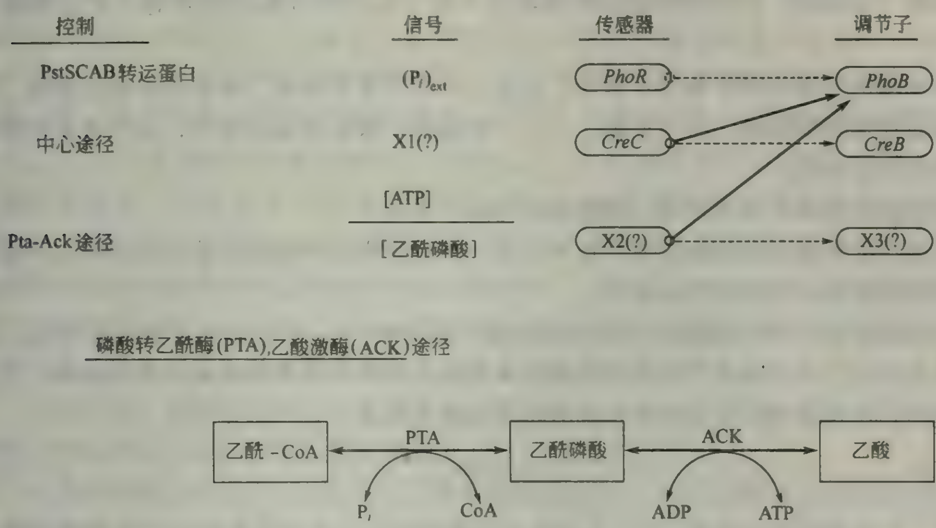


图 5.17　Pho 调节子的控制

虚线箭头表示伙伴蛋白之间的相互作用，而实线箭头表示非伙伴蛋白之间交叉调控

5.4　代谢网络的调控

代谢调控的实质就是作为调控变量的反应速率对各种信号的响应（这些信号通常包括代谢物、效应物及其它调节分子的浓度）。这种控制系统的基本性质是其实际输出仅由信号决定，因而是与该控制系统各个组分的性质无关的。与控制液体流动的一个阀门类似，一个反馈调节的酶反应能力大于最大的可能的通量，而通量本身仅由信号决定。虽然酶和信号的总量分别决定了最大通量及实际通量的大小，但该控制的动态性质是特定调控机制的函数，如下述讨论。

在由多于一种酶构成的一条代谢途径中，途径通量是由途径中各个酶的动力学及调控来决定的。对于中心碳代谢途径（如糖酵解和 TCA 循环）中，虽然这些酶不是以物理方式组织的，但它们在一个化学框架中被高度组织起来。在一些情况下，途径通量由存在的一个酶的总量所控制，该酶量低得足以将其定为一个速率控制步骤（见第 11 章）。在另一些情况下，途径通量控制分布在几个酶当中，而途径中其它反应进行得很快并变得由底物或辅因子浓度所限制。在这种代谢框架中，催化活动不是酶的惟一功能，因为它们在途径通量的调控中也起重要作用。尽管不必在物理上接触，但每个酶可通过特定的化学信号（如底物、产物

或特定调节物如 ATP，NADH 等的浓度）向其报告代谢途径的状态，这些化学信号控制酶反应速率进而扩大到控制途径通量。在一个功能性细胞中，反应速率必须被精确调整。因此，很容易把别构酶看做动态实体，其中酶的结构对在底物水平和别构激活剂或抑制剂水平的相当小的变化很敏感。这些结构改变是通过改变酶与其底物的亲和力而影响酶活性的，这显著不同于通过抑制剂的共价结合而引起酶的失活。

催化非平衡反应的酶的识别为网络的调节控制提供线索。理解代谢控制的困难之一在于调节酶的确定，因为在某种程度上，一个途径中所有酶的活性都需与通过途径的通量改变相协调。于是，关键问题就变成是否存在一种酶，其首先响应于原始代谢信号（主宰酶），从而在剩余酶（从属酶）的活性中启动次级响应。用于识别调节酶而发展的一系列判据简述如下。

- 这种酶应当催化非平衡（不可逆）反应。一个“非平衡酶”具有低的催化活性，因此其能限制通过途径的通量。另一方面，一个“平衡酶”被认为是过量的，而且通量对其扰动不会显著地产生响应。
- 这种酶应当具有调节性质，例如别构位点。

也可能没有单独的调节酶存在，但可以说一条途径中几种酶的活性是先后响应于变化着的条件和随之引起的代谢信号而改变。

确立代谢通量 J 和一条途径中某种酶的量（或活性）c_e 之间的关系是很重要的，虽然确切的关系取决于很多参数，包括途径酶的本征动力学和产物及别构调节物的影响，但在大多数情况下，已经提到一个如下所示的通用双曲线关系式：

$$J = \frac{J_{max} c_e}{(c_e + K)} \tag{5.14}$$

式中，J 为观测到的通量；J_{max}为无限多的酶存在时所得到的通量；c_e 为对特定酶可分析的最大体外活性；K 为一个常数，定义为当 $J = J_{max}/2$ 时的 c_e 值（与 K_m 类似）。因此，当活性小时，途径通量随酶的可利用率线性增加，但最终途径通量将被其它因素限制，例如底物可利用率，途径中另一个酶的活性，或一个抑制性产物的累积。

方框 5.4　真核生物相对于原核生物的调节

真核生物与原核生物的调控系统是非常不同的，这是它们的不同“生活方式”的反映。虽然原核细胞与真核细胞所具有的很多功能是十分类似的，但它们在若干结构的及遗传的性能方面有区别。原核细胞通常是自由生活的单细胞生物，在环境条件适宜且营养充足的情况下，它们可进行无限制的生长和分裂。原核生物系统的调节是为了适合最大生长而营养利用尽可能高效。由于没有核，原核生物的 DNA 连续暴露到来自细胞质的调节信号；因此蛋白质合成的开-关控制常在转录水平上来完成。另一方面，真核生物通常是多细胞的（酵母、藻类和原生动物门除外）更大及结构上更复杂的生物（Towle，1995）。细胞分化尤其需要特定的调控类型，因为不同组织的细胞有不同的需求（Hofestadt 等，1996；krauss 和 Quant，1996）。例如，在一个胚胎中，一个细胞不仅需产生新一代细胞，而且也需经历许多相当大的形态的和生化的变化，并需无限维持这些变化。这类永久的开关需要在这类细胞中运用其它的调控策略，例如基因丢失、基因失活、基因扩增和基因重排。

哺乳动物代谢可通过营养底物和激素在遗传水平进行调控。第一个清楚的证据是通

过如下发现而提供的：色氨酸和肾上腺糖皮质激素调节肝脏中色氨酸二氧化酶的活性。当存在的氨基酸超过蛋白质合成需要时，该酶启动了色氨酸的利用。这条途径对葡萄糖异生中的色氨酸利用及含烟酰胺辅助因子的内源性合成是必不可少的。与细菌中乳糖利用的迅速增加相比，色氨酸二氧化酶的研究表明类固醇（例如皮质醇）需要8～12h才能达到稳态酶和相应的mRNA水平。这是一个普遍现象：细菌中的酶诱导在30～40min达到最高水平，而在哺乳动物中此过程需几个小时，有时甚至需要几天才能完成。

单细胞和多细胞生物体显著差别详见表5.4，这代表着在基因调控理解中的一个重要方面。根据这两种基因的大小，*lac* 操纵子可在2min之内转录，而色氨酸二氧化酶基因需要约6min才能完成一轮转录。这种时间差别与转录起始速率的显著差别相比仍然是小的，因此，转录起始就变成速率控制步骤。此外，原核生物的翻译效率比真核生物高约3倍。这些影响，连同比较如下事实：一个生长中的大肠杆菌细胞的典型细胞体积约 $1\mu m^3$，一个典型的肝细胞体积约为 $11000\mu m^3$，从而使得原核细胞可非常快地达到高的催化剂浓度。与相对较长的哺乳动物mRNAs的半衰期相比（其范围是20min～100h），细菌mRNAs的半衰期一般只有1～3min。细菌中大部分蛋白是相对稳定的，但是细胞分化的结果使得每个细胞内的蛋白被稀释了。因此，细胞中实际的蛋白质半衰期与世代时间相一致，介于20～60min的范围。总的说来，遗传控制机制本质上更适合于原核生物，允许它们迅速地调节酶浓度以满足变化着的细胞要求。

如前所述，真核生物与原核生物系统之间存在一些基本的差别。关于两个系统之间的遗传学及调控方面的一些区别概括如下。

- 真核细胞仅将mRNA翻译成一条单独的多肽链，因而排除在原核细胞中常见的多基因操纵子的存在。
- 和原核细胞DNA不同，真核细胞DNA只有一小部分是裸露的。其与组蛋白大量结合以形成染色质。
- 高等真核细胞大部分DNA序列由不被翻译的区域（内含子）组成。
- 真核细胞具有以可控的方式重新排列DNA片段的机制，因而允许它们根据需要而增加基因的拷贝数。
- 原核生物的转录调节区很小，靠近并常在启动子上游，蛋白与这些位点的结合直接刺激RNA聚合酶的结合。相对地，相应的真核细胞转录调节区大很多，且与启动子相距约达几百个碱基。虽然它们结合蛋白，但由于特定的限制，它们不能同时与启动子发生相互作用。
- 在真核细胞中，RNA在细胞核中合成，并且必须穿过核膜被运输到细胞质后才被翻译。

总之，真核细胞中mRNA的生产比在原核细胞中要复杂得多，因此可以想象有许多调节点。例如，启动子可利用率可由染色质状态、转录因子的活性或浓度，或强化因子可利用率来确定。来自初级转录的mRNA的生产可以通过拼接及多聚腺苷酸化的控制来进行调控。mRNA寿命的调控在原核细胞很少遇到，因为频繁需要相当快地打开或关闭所调控的基因产物的合成。另一方面，通常有更多的时间去应答的真核细胞当大量特定蛋白需要时可使用延长mRNA寿命的战略。

表 5.4 大肠杆菌和哺乳动物细胞间转录和翻译时间尺度的比较

项　目	大肠杆菌	哺乳动物
起始	$1s^{-1}$	$10min^{-1}$
转录	$2500nt\cdot min^{-1}$	$3000nt\cdot min^{-1}$
RNA 加工		大约 10min
核(内)RNA $t_{1/2}$		大约 10min
核质转运		大约 10min
mRNA $t_{1/2}$	1～3min	1～20h
mRNA 翻译	$2700nt\cdot min^{-1}$	$720nt\cdot min^{-1}$
蛋白质 $t_{1/2}$	20～60min	2～100h

注：nt＝核苷酸。

对于处于“基础”水平的控制用酶，酶浓度的小的增加可能使通过途径的通量线性增加。然而，酶浓度的增加超过某一水平则是无效的，因此，为了优化及协调通量就需考虑其它因素。根据经验，在许多情况下，将某特定酶的转录水平增加 10 倍以上是不实际的。从细胞经济观点来看，这是十分重要的，因为细胞的资源是有限的，而且在许多途径中存在着相同前体库竞争要求。例如，对某一结构单元的需求突然下降，经济的办法就是将产生这种特定单体的酶水平和酶活性两者都减少。对在基本培养基中生长的细胞，通过利用放射性标记的底物可以表明，在氨基酸加入后的几秒钟内，所有流向其生物合成的碳流停止了。这些途径通量控制问题将在第 11 章讨论代谢控制分析时再次遇到。

5.4.1　分支点分类

通常，在生物过程中很差的产品得率归因于由酶水平或酶活性而引起的限制。虽然产品分支处的酶的总活性决定着生产能力，然而，产品得率是在中间分支点处通量分配比的函数。中间分支点又称为节点，它是代谢网络中一个反应序列分叉成两条或更多条不同途径的一些点。例如，图 5.18 中产物 P_1 的得率取决于在节点 I 处的通量分配比，而不是取决于 I 到 P_1 分支本身的活性。因为合成初级代谢物的途径通常能够支撑相当的通量，代谢工程的努力应集中于在所选择的代谢分支点处改变通量的分配以提高产物收率。

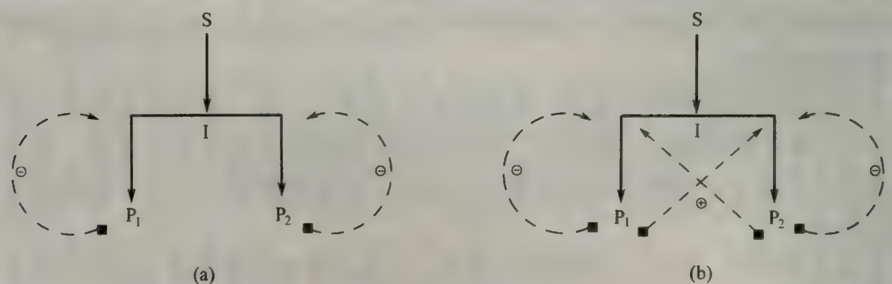


图 5.18　代谢节点

(a) 柔性或弱刚性节点；(b) 强刚性节点

虚线表明（负或正）反馈控制机制

虽然一个网络可由大量的节点组成，一般相信在相当少的节点处的分配比实际上影响产物得率。这些节点称为主节点。虽然由不同生物体调节通量所用的控制结构显著地变化着，然而基于其分支点刚性有可能将节点分成三大类（Vallino，1991）。

● 柔性节点（对调节显著亚敏感）：在此类节点处通量分配响应于细胞代谢需求，将容易发生改变。这些节点通过有类似的底物亲和力和类似的反应速率的竞争性酶来表征。由定

义，柔性节点将不限制产物得率，因为无论何时只要需要，任何分支可以得到 100% 的分配比。

● 弱刚性节点（对调节适度敏感）：在这些节点处通量分配由一个支路控制。起支配作用的酶通过具有高的比活性和/或底物亲和力以及与没有反馈抑制一起来进行表征。

● 强刚性节点（对调节高度敏感）：在这些节点处的通量分配在 1 个或多个支路，通过反馈控制与酶转移活化的结合而被严格控制，该转移活化是通过来自一条分支途径的代谢物而进行的。

在一个柔性节点，通量分配比仅取决于细胞对两个产物 P_1 和 P_2 的需求［见图 5.18 (a)］。弱刚性节点与柔性节点类似，但有如下不同：一条分支途径比其它一条（一些）分支途径呈现显著优势。这是由于相应的酶对共同代谢物有更大的亲和力和/或比下一级分支途径的酶有更大的总活性。在这种情况下，完全解除对下一级支路的调控对通量将不会有显著影响。另一方面，如果优势分支途径的活性被减弱，这会显著增加通过下一级分支途径的通量。一个强刚性节点是由终端产物激活或抑制高度调控，如图 5.18（b）所示。在此例中，每个产物代谢物作为竞争分支途径的一个激活剂，同时又作为其自己形成的一个抑制剂。一个刚性节点对途径产物得率能有控制性的影响，它的解除调控比酶活性减弱可能更复杂。

让我们假定所希望的目标是增加 P_1 分支途径通量分配比，而且在激活剂 P_2 不存在时，P_1 的稳态浓度高得足以抑制它本身的合成。在这种情况下，增加 P_1 分支途径的分配比会要求去 P_2 的通量被减弱。然而，在强刚性节点，这种方法将导致低水平的 P_2，所以 P_1 分支途径将会由于 P_2 而失去其活化作用。简而言之，一条分支途径的减弱导致竞争分支途径的减弱（整个节点的衰弱），结果是每条分支途径的分配比相对来说没有改变。

因为复杂的及多样的控制结构和酶动力学（Srere，1994），代谢网络并不总是呈现上述分类所包含的通量分配的双重响应。因此，一个强刚性节点的一条分支途径的减弱可能仅导致竞争分支途径的部分减弱，以致产物得率的改进可以在一个含有刚性节点的互相关联的网络中得到。也有可能减弱不要的途径会引起中间代谢物的分泌，而不是通量减小或通量改向。

虽然其它可能的控制结构也能提出而且其会产生一个刚性节点，任何此类控制的关键方面是竞争分支途径之间一个反馈调节机制的存在（相互影响，cross-talk），这将有保持一个恒定通量分配比的趋势。一个刚性节点不仅能限制产物得率，而且通过简单的酶活性减弱不容易减轻这种影响。

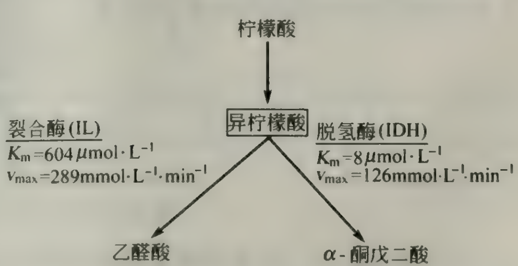


图 5.19　异柠檬酸分叉点处酶的动力学参数

图 5.19 所示的乙醛酸支路是一个全面研究了的代谢分支点。当细胞在醋酸盐上生长时，异柠檬酸裂合酶（IL）被诱导，而且在提供补碳方面起重要作用（见第 2 章），否则会在 TCA 循环中作为 CO_2 而被失去。当在醋酸盐上生长时，异柠檬酸脱氢酶（IDH）主要处于磷酸化状态（大约 80%），从而使其没有活性。当给予细胞更有利的碳源时，如葡萄糖，IDH 就会迅速脱磷酸而导致其活化。

图 5.19 概括了在乙酸盐上生长时两种竞争酶的动力学参数（葡萄糖可使 IDH 的 v_{max}增加 5 倍）。该分支点的一个重要特征是各自的 K_m 值极不一致：IL 有一个 75 倍高的 K_m 值。

在异柠檬酸生理浓度时（约 160μmol·L^{-1}），IL 对于异柠檬酸为一级，而 IDH 被共同底物所饱和。因为这两种酶的动力学的共同控制，通过该支路的通量对异柠檬酸浓度水平的变化极端敏感。在乙酸盐生长培养基中加入葡萄糖，不仅引起 IDH 的 v_{max}的提高，同时引起通过柠檬酸合成酶的碳流的相应减少，其总结果是降低了胞内异柠檬酸水平（大约 170 倍）。因为与 IDH 相比，IL 对异柠檬酸有一个显著高的 K_m，所以异柠檬酸浓度的下降使通过该支路的通量减少到一个很大程度（约 99%）。因此，虽然没有已知的别构调节剂直接作用到 IL 上，通过它的通量可从总的 30%下降到实际上为零。这种控制有很有趣的特性：最受影响的酶 IL 是不易直接控制的，这已经被称做“分支点效应”。

5.4.2 耦合反应与总体流通代谢物的作用

生物合成反应一般都依赖于 ATP 的供应，若 ATP 供应不足则生物合成受阻。ATP 及其相关分子 ADP、AMP 在中心碳代谢供能反应的调控中比其仅仅参与在代谢反应中起着更加重要的作用。这些中心分解代谢过程（糖酵解和 TCA 循环）为生物合成提供原料，如图 5.20 所示（也可见 2.1 节）。这些途径通过不仅提供前体代谢物同时也提供自由能和辅助因子而提供一个基本的合成代谢功能。因此，此类途径被称为“无定向代谢途径”以表明它们在分解代谢和合成代谢中的双重作用（Sanwal，1969，1970）。这些途径的调节应当反映出其双重功能，即确保正确的及协调的碳骨架流进生物合成途径和产能途径。严格地说生物合成或分解途径主要区别于用以通量控制的调节信号的性质（Vaulont and Kahn，1994）。

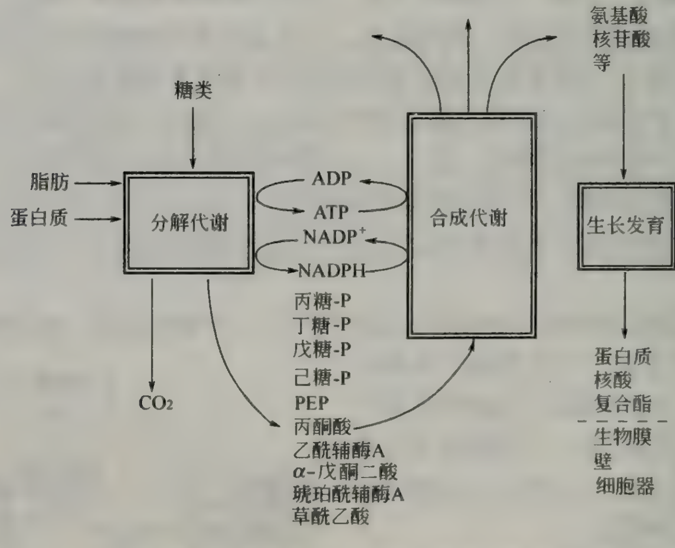


图 5.20　需氧异养代谢的图解方块图

在两种情况下，反馈抑制总是施加在催化途径第一步反应的酶上。如果糖酵解或 TCA 循环仅由能荷调节，那么在充足的能量供应条件下，通过这些途径的通量将会急剧减少。然而，伴随着 ATP 再生的减少，这种反馈机制也会限制生长中间物的可利用率，从而损害生长。这样的响应只会是次优，因为当资源供应丰富时生长也会被限制。

为了满意地调控一个同时具有两种服务功能的过程，已经发展了一个需要两个输入的高级机制：一个是生物合成中间物水平的测量，另一个是能量水平预示（Anthong，1988；Atkinson，1970，1977；Dietzler et al，1979；Nicholls，1992）。信号 1：第一信号是一个特定途径的终端产物而且通常在严格合成过程中找到。现在有大量例子可以用来表明大多数生物

合成途径的调控都包括简单的反馈机制，其中最终产物抑制包括在该产物合成过程中的第一步，例如苏氨酸抑制高丝氨酸脱氢酶，异亮氨酸抑制苏氨酸脱氨酶，组氨酸抑制磷酸核糖-ATP 焦磷酸化酶，色氨酸抑制氨基苯甲酸合成酶等（见例 5.1)。信号 2：第二信号是严格分解代谢途径的特征，而且是能量代谢的最终的（中间的）产物（即 P_i，AMP，ADP，ATP，NADH，NADPH)，例如，由 AMP 激活的产气肠杆菌的生物可降解性苏氨酸脱氨酶，或由 P_i 抑制的铜绿假单胞菌的生物可降解性组氨酸酶以及由 AMP 和 GDP 所解除的抑制。

无定向代谢途径采用两种通量控制方式（即由终端产物抑制，及由作为细胞能量状态指示器的代谢物的活性抑制）。当任何一个信号低时，糖酵解将继续进行；当两者均处于正常范围时，糖酵解功能适度提供，通过该途径的通量减小。当然在一个正在代谢葡萄糖的细胞中糖酵解途径决不会完全关闭，因为 ATP 持续不断被需要。相应于 12 种前体代谢物相互之间以及相应于生物合成需要的 12 种前体代谢物生成速率的平衡，包括了一个高度复杂的调控机制。协调的需要超过了含碳代谢物；供能反应必须提供能量和还原力（NADH 和 NADPH 两者)，因此，毫不奇怪，在网络中许多节点，这些化合物本身是异构效应物。

$$能荷(EC)=\frac{c_{ATP}+\frac{c_{ADP}}{2}}{c_{ATP}+c_{ADP}+c_{AMP}} \tag{5.15}$$

由式（5.15）给出的能荷对通量的协调控制及生物合成前体的可利用率示于图 5.21 中。

通过腺苷酸库的实验测量所确定的能荷可以在 0（全部 AMP）和 1（全部 ATP）之间变化。实际上，对细菌，这个值在 0.87～0.95 的范围内变化，而且随比生长速率改变没有显著变化。一般说来，高水平能荷值通常抑制补充能量的酶，而它们激活利用 ATP 的酶（例如生物合成酶)，反之亦然。

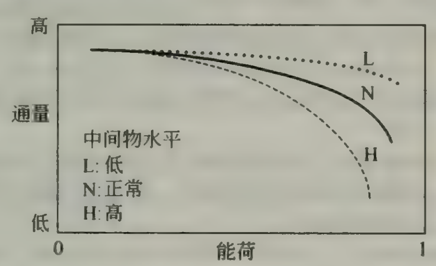


图 5.21　在调节无定向代谢途径的速率中能荷与代谢中间物浓度之间的相互作用

对氧化-还原反应，存在一个类似的情况，这时反应通过一个“还原荷”进行类似的调控。吡啶核苷酸用作 H 离子或还原力的运输载体，而 NAD 主要在供能途径的氧化还原反应中起作用，NADP 通常用于生物合成反应。在供能反应中，氧化了的 NAD 是反应物而合成反应利用 NADP 的还原形式。因此毫不奇怪，在生理条件下大部分 NAD 在胞内以氧化了的形式存在而 NADP 以还原形式存在。氧化还原状态的有用指标是分解代谢还原荷（约 0.03～0.07）和合成代谢还原荷（约高 10 倍)。

$$分解代谢还原荷(CRC)=\frac{c_{NADH}}{c_{NADH}+c_{NAD}} \tag{5.16}$$

$$合成代谢还原荷(ARC)=\frac{c_{NADPH}}{c_{NADPH}+c_{NADP}} \tag{5.17}$$

ARC 和 CRC 在协调供能反应与生物合成反应中都起着重要作用，尽管它们的作用不如能荷的作用那样清楚。在大部分细胞中四种供能反应引起 NADPH 生产以用于生物合成（两种在磷酸戊糖途径，一种是异柠檬酸脱氢酶；一种是苹果酸酶)。CRC 和 ARC 的调节被认为是通过转氢酶而发生的，该酶催化如下可逆反应：

$$NADP + NADH_2 \rightleftharpoons NADPH_2 + NAD$$

这是一个膜-结合酶，它由质子驱动力驱动；因此其只能在具有能量的膜上进行，该反应的平衡认为是由质子驱动力来改变（参见第2章）。

参 考 文 献

Anthony, C. (1988). *Bacterial Energy Transduction*. pp. 517. San Diego, CA: Academic Press.

Atkinson, D. E. (1970). Enzymes as control elements in metabolic regulation. In *The Enzymes*, pp. 461. Edited by P. Boyer. San Diego, CA: Academic Press.

Atkinson, D. E. (1977). *Cellular Energy Metabolism and Its Regulation*. New York: Academic Press, Inc.

de Koning, W. & van Dam, K. (1992). A method for the determination of changes of glycolytic metabolites in yeast on a subsecond time scale using extraction at neutral pH. *Analytical Biochemistry* **204**, 118-123.

Dietzler, D. N., Leckie, M. P., Lewis, J. W., Porter, S. E., Taxman T. L. & Lais, C. J. (1979). Evidence for new factors in the coordinate regulation of energy metabolism in *Escherichia coli*. *Journal of Biological Chemistry* **254**, 8295-8307.

Dixon, M. & Webb. E. C. (1979). *Enzymes*, 3rd ed. New York: Academic Press.

Haldane, J. B. S. (1965). *Enzymes*. Cambridge, MA: MIT Press.

Hardie, D. G. (1992). Regulation of fatty acid and cholesterol metabolism by the AMP-activated protein kinase. *Biochimica Biophysica Acta* **1123**, 231-238.

Harford, S. & Weitzman, P. D. J. (1975). Evidence for isosteric and allosteric nucleotide inhibition of citrate synthase from multiple-inhibition studies. *Biochemical Journal* **151**, 455-458.

Heinrich, R. & Sonntag, I. (1982). Dynamics of non-linear biochemical systems and the evolutionary significance of time hierarchy. *Biosystems* **15**, 301-316.

Hiromi, K. (1979). *Kinetics of Fast Enzyme Reactions: Theory and Practice*. New York: John Wiley & Sons.

Hofestadt, R. M., Collado-Vides, J. & Loffler, M. (1996). Modeling and simulation of metabolic pathways, gene regulation and cell differentiation. *BioEssays* **18**, 33.

Hofmeyr, J. -H. S. (1991). Metabolite channelling and metabolic regulation. *Journal of Theoretical Biology*. **152**, 101.

Hoopes, B. C. & McClure, W. R. (1987). Strategies in regulation of transcription initiation. In *Escherichia coli and Salmonella typhimurium*, pp. 1231-1240. Edited by F. C. Neidhardt. Washington, DC: American Society for Microbiology.

Ingraham, J. (1987). Effect of temperature, pH, water activity, and pressure on growth. In *Escherichia coli and Salmonella typhimurium*, pp. 1543-1554. Edited by F. C. Neidhardt. Washington, DC: American Society for Microbiology.

Iserentant, D. & Fiers, W. (1980). Secondary structure of mRNA and efficiency of translation initiation. *Gene* **9**, 1-12.

Khoshland, D. E. J. (1970). The molecular basis for enzyme regulation. In *The Enzymes*, pp. 461. Edited by P. Boyer. San Diego, CA: Academic Press.

Khoshland, D. E. J. & Neet, K. E. (1968). The catalytic and regulatory properties of enzymes. *Annual Reviews of Biochemistry* **37**, 359.

Krauss, S. & Quant, P. A. (1996). Regulation and control in complex, dynamic metabolic systems: Experimental application of the top-down approaches of metabolic control analysis to fatty acid oxidation and ketogenesis. *Journal of Theoretical Biology* **182**, 381.

Ku, E. C. (1996). Regulation of fatty acid biosynthesis by intermediates of the cholesterol biosynthetic pathway. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **225**, 173.

Kurganov, B. I. (1982). *Allosteric Enzymes: Kinetic Behaviour*. New York: John Wiley & Sons.

Laidler, K. J. & Bunting, P. S. (1973). *The Chemical Kinetics of Enzyme Action*. London: Oxford University Press.

Lee, T. -Y., Makino, K., Shinagawa, H. & Nakata, A. (1990). Overproduction of acetate kinase activates the phosphate regulon in the absence of the *pho*R and *pho*M function in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology* **172**, 2245-2249.

Monod, J., Changeux, J. -P. & Jacob, F. (1963). Allosteric proteins and cellular control systems. *Journal of*

Molecular Biology **6**, 306-329.

Müller-Hill, B. (1996). *The lac Operon: A Short History of a Genetic Paradigm*. Berlin: Walter de Gruyter & Co.

Neidhardt, F. C. (1987). Multigene systems and regulons In *Escherichia coli and Salmonella typhimurium*, pp. 1313-1317. Edited by F. C. Neidhardt. Washington, DC: American Society for Microbiology.

Neidhardt, F. C., Ingraham, J. L. & Schaechter, M. (1990). *Physiology of the Bacterial Cell: A Molecular Approach*. Sunderland, MA: Sinauer Associates, Inc.

Nicholls, D. G. (1992). *Bioenergetics* 2, 2nd ed. San Diego: Academic Press Limited.

Rapoport, T. A., Heinrich, R., Jacobasch, G. & Rapoport, S. (1974). A linear steady-state treatment of enzymatic chains: A mathematical model of glycolysis of human erythrocytes. *European Journal of Biochemistry* **42**, 107-120.

Sanwal, B. D. (1969). Regulatory mechanisms involving nicotinamide adenine nucleotides as allosteric effectors. I. Control characteristics of malate dehydrogenase. *Journal of Biological Chemistry* **244**, 1831-1837.

Sanwal, B. D. (1970). Allosteric controls of amphibolic pathways in bacteria. *Bacteriological Reviews* **34**, 20-39.

Schulz, A. R. (1994). *Enzyme Kinetics: From Diastase to Multi-Enzyme Systems*. Cambridge: Cambridge University Press.

Schuster, R., Jacobasch, G. & Holshütter, H. -G. (1989). Mathematical modeling of metabolic pathways affected by an enzyme deficiency. Energy and redox metabolism of glucose-6-phos-phate-dehydrogenase-deficient erythrocytes. *European Journal of Biochemistry* **182**, 605-612.

Segel, I. H. (1993). *Enzyme Kinetics. Behavior and Analysis of Rapid Equilibrium and Steady-State Enzyme Systems*. New York: John Wiley & Sons, Inc.

Shin, P. K. & Seo, J. -H. (1990). Analysis of *Escherichia coli pho*A-*lacZ* fusion gene expression inserted into a multicopy plasmid and host cell's chromosomes. *Biotechnology and Bioengineering* **36**, 1097-1104.

Srere, P. (1994). Complexities of metabolic regulation. *Trends in Biochemical Sciences*. **19**, 519.

Stadtman, E. R. (1966). Allosteric regulation of enzyme activity. In *Advances in Enzymology and Related Subjects of Biochemistry*, pp. 41-154. Edited by F. F. Nord. New York: John Wiley & Sons.

Stormo, G. D., Schneider, T. D. & Gold, L. M. (1982). Characterization of translational initiation sites in *E. coli*. *Nucleic Acids Research* **10**, 2971—2996.

Towle, H. C. (1995). Metabolic regulation of gene transcription in mammals. *Journal of Biological Chemistry* **270**, 23235.

Umbarger, H. E. (1978). Amino acid biosynthesis and its regulation. *Annual Reviews of Biochemistry* **47**, 533-606.

Vallino, J. J. (1991). Identification of branch-point restrictions in microbial metabolism through metabolic flux analysis and local network perturbations. In *Chemical Engineering*, pp. 394. Cambridge, MA: Massachusetts Institute of Technology.

Van Dam, K., Jansen, N., Postma, P., Richard, P., Ruijter, G., Rutgers, M., Smits, H. P., Teusink, B., van der Vlag, J. & Walsh, M. (1993). Control and regulation of metabolic fluxes in microbes by substrates and enzymes. *Antonie van Leeuwenhoek* **63**, 315-322.

Vaulont, S. & Kahn, A. (1994). Transcriptional control of metabolic regulation genes by carbohydrates. *FASEB Journal* **8**, 28.

Walter, C. (1965). *Steady State Applications in Enzyme Kinetics*. The Ronald Press.

Wanner, B. L. (1992). Is cross regulation by phosphorylation of two-component response regulator proteins important in bacteria? *Journal of Bacteriology* **174**, 2053-2058.

Wanner, B. L. & Wilmes-Riesenberg, M. R. (1992). Involvement of phosphotransacetylase, acetate kinase, and acetyl phosphate synthesis in control of the phosphate regulon in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology* **174**, 2124-2130.

Webb, J. L. (1963). *Enzyme and Metabolic Inhibitors*. San Diego, CA: Academic Press.

第 6 章　途径操作实例——代谢工程实践

大自然已提供大量值得注意的代谢途径，现存微生物的多样性可证实这一点。某些情况下，在一特定生物体中这些途径的组装及动力学协调对于一个有用的商业应用来说是适合的。然而，大多数情况下，需要进行遗传改进以使细胞的转化反应及动力学特性得到优化，使之适宜于实际需要。这些改进是以目前对微生物代谢和分子遗传学的理解来指导，而通过分子生物学技术和重组 DNA 技术来实行的。转化途径的合理转移已经在许多细胞中产生了新的合乎需要的功能，因此有益于制药、农业、食品、化学和环境等方面。

本章，将回顾代谢途径操作的应用。主要根据 Cameron 和 Tong（1993）的分类方法，稍加调整，将大量实例组成五种基本类型，即应用目的：(a) 微生物生产的产品得率和生产能力；(b) 扩大生物体可代谢的底物范围；(c) 产生新的和独创的产品；(d) 细胞性能的总体改进；(e) 异生物的降解（xenobiotic degradation)。结合本书上下文的前后关系，综述这些应用有三个目的。首先，提供一个可能性范围确实非常大的样本，该可能性是指由途径操作及代谢工程所提供的对生物催化剂改进的可能性。特别提出本概述几乎排除其它而只集中于工业应用。除了绪论（第 1 章）和一些偶尔提到以外，几乎没包括代谢工程在医学领域的广泛应用。原因仅仅是在该领域的大部分工作刚刚流行而不足以在本书的综述中定形。然而，所报告的进展对代谢工程的工具和方法的影响几乎没有留下任何疑问，这些工具及方法涉及在体内或体外对组织和器官进行分析，同时也为信号转导途径的组织及功能的合理设计提供基础。

综述的第二个目的是向读者提供代谢途径、还有它们的调控及与总体代谢协调等方面复杂性的意识和辨别力。这些途径公认的复杂结构的一个重要推论是对它们系统分析的方法并不总是像人们所希望的那样简单。当我们在钻研代谢通量确定方法（第 8 章、第 9 章)、研究复杂代谢网络中的控制及代谢通量扩增问题时（第 11 章、第 12 章)，就会清楚认识到这一点。以同样的方式，对细胞代谢的状态、代谢生产途径或信号转导途径进行具有代表性的分析时，可能需要一批多维的分析测量，这不同于目前的实际做法。在大量测量中真正辨认出类型的识别将是一个挑战，而通量分析会为此目的提供一个有用的框架。

本综述的第三个目的是强调那些为了工业应用或医学的原因，在细胞体系中为实现所希望的变化所用的方法。最成功的应用需要对一个代谢网络中多于一个酶反应步骤进行协调修饰，这将会变得很明显。这对扩大到超出一条简单的产品形成途径和包括中心碳代谢的复杂结构等应用来说几乎是必需的。我们相信这将变成一个普遍需求，因为研究焦点逐渐从高度简化的模型系统变换到实际的工业或医学处境的范围。正如前面提及的复杂测量的解释一样，代谢工程能对合理修饰代谢途径产生影响。

6.1　产品得率及生产能力的提高

大多数主要的工业应用都可归于此类型。注意到，尽管得率和生产能力通常在不太严格时可以互换，但得率和生产能力代表着不同价值的数字，使它们提高需要不同的策略。得率主要影响原料的成本，并受代谢通量向有助于目标产物生成的方向改向所影响。另一方面，

生产能力是生物加工设备基本投资费用的关键性决定因素，它可通过代谢通量的扩增而改进。大家公认，整个过程的优化必须包括得率和生产能力二者都关心的事，尽管在某些情况下，二者的解耦也许是可能的。生产能力首先依赖于底物吸收的比速率，对大多数工业微生物来说，该值范围为0.2～0.5g底物/(g生物基质·小时)。如果在生产条件下该比吸收速率可以实现，那么倘若副产品生成最小，则生产能力在经济上是可以接受的。在这些条件下，得率和生产能力的优化方法可以真正趋于一致。另一方面，若底物吸收速率太低，那么生产能力的优化应先从底物运输系统的扩大开始，接着进行通量改向，这已由得率优化策略所阐明。

很明显，得率和生产能力在大规模、低成本工业生产中更为重要。下面我们将叙述目的在于通过代谢工程改进乙醇、氨基酸和溶剂的得率及生产能力所做的努力。

6.1.1 乙醇

乙醇是一种重要的工业化学品，并正显露出作为一种生物燃料取代正在耗尽的化石燃料的潜力。此外，乙醇对环境会有有意义的影响，这是由于乙醇燃烧时污染小，并且它还能作为原料生产含氧燃料（oxygenated fuel）。还有，因为乙醇的生产主要基于农产品，这将加快大气CO_2移除的“碳循环”。据目前的估计，到2010年，美国将进口50%以上的原油及其精制产品以满足能源之需。从经济观点来看，通过提供国内资源以满足部分需要，乙醇（及其它生物燃料）在稳定能源价格、改善国家能源安全及确保农村和区域经济发展中能够起重要作用。

乙醇可由一些可再生原料制得。包括糖类作物（如甘蔗），含淀粉谷物（如玉米），或木质纤维素材料（包括农业废弃物、草本作物和树木等）。乙醇过程经济学取决于糖的费用。美国每年23亿升燃料乙醇几乎全是由玉米生产的，据估计用剩余的玉米每年还可生产约200亿升乙醇。在过去的10年间，乙醇生产成本从1.0美元/L以上降至约0.3～0.5美元/L，预计在不久的将来，其成本将低于0.25美元/L。

木质纤维素材料是来源丰富且价廉的一种资源，其目前的供应能够以美国总的液体运输燃料消耗量的同样规模支持液体运输燃料的可持续生产。美国国家可再生能源实验室（NREL）估计，目前由木质纤维素生产的乙醇成本约为0.32美元/L，这是基于每吨干重原料价格为42美元的假定(National Renewable Energy Laboratory，1996)。这个平均生物质成本相当于每千克糖约0.06美元，或折算为生产乙醇产品的原料成本0.10美元/L。所考虑的木质纤维作物作为生产燃料乙醇的合适原料，包括快速生长的树木、农业或林业的残余物和各种各样的废物，例如制浆废物、废报纸和城市固体废物。木质纤维素原料的半纤维素组分（硬木材干重的25%，且主要是D-木糖）的有效利用为降低燃料乙醇生产成本（约25%）提

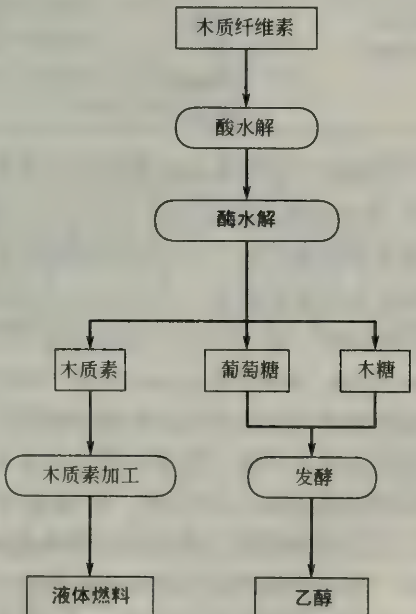


图 6.1 木质纤维素转化为乙醇

结晶状纤维素是含量最大（50%）和最困难的部分，是通过酸法、酶法两个过程的组合而水解的。在此过程中95%～98%的木糖与葡萄糖被回收，这些单糖接着由合适的微生物转化为乙醇

供了一个机会（Bull，1990）。虽然木质纤维素价格低廉，但由于它不能被人体消化，因而不能作为食物来竞争，它不能被消化也使它难以转化为可发酵的糖。此外，木质纤维素是含有三种主要组分（即纤维素、半纤维素和木质素）的一种复杂结构，每一个组分必须单独处理以充分利用生物过程中固有的高功效。图 6.1 所示为由木质纤维素转化为乙醇的一般过程。经预水解和水解处理后产生的水解产物中含有单糖（其量在改变着），其存在形式包括：戊糖（D-木糖和 L-阿拉伯糖）和已糖（见表 6.1）。水解产物中还包括范围很广的物质，其衍生于原材料或在过程预处理阶段作为反应副产物而形成（糖和木质素降解产物）。在硬木和作物残余物的半纤维素中，木糖是含量最丰富的糖，而在软木的半纤维素中甘露糖含量更丰富。此外，自然界中木糖的含量仅次于葡萄糖。单单是残存在废纸中和美国掩埋式垃圾处理场的庭院垃圾中的糖类残渣，经微生物转化就会提供 4000 亿升以上的乙醇（Lynd et al，1991），10 倍于每年燃烧的由谷物生产的乙醇。乙醇是以 10%与汽油混合后作为液体燃料燃烧的（Keim and Venkatasubramanian，1989）。

用于发酵的微生物必须能利用水解产物中存在的所有的单糖，还必须能耐受可能存在的抑制剂。使用最普遍的乙醇生产菌啤酒酵母（*Saccharomyces cerevisiae*）不能发酵约占原料 8%～28%的戊糖（Ladisch et al，1983）。酵母可通过丙酮酸脱羧酶-乙醇脱氢酶系（PDC-ADH）由已糖有效地生产乙醇。然而，在木糖发酵期间会积累副产物木糖醇，从而降低乙醇得率。另据报道，酵母只能非常微弱地发酵 L-阿拉伯糖。为了开发一个经济上能生存的、从生物质生产乙醇的过程，可以证明木糖和其它半纤维素组分的有效发酵是最基本的。

表 6.1　典型软木材（如山毛榉）的木质纤维素中碳水化合物结构的多聚体

多聚体	单　体	含量/%	多聚体	单　体	含量/%
纤维素	葡萄糖	40	半纤维素	葡萄糖	
半纤维素	木糖	30		半乳糖	
	阿拉伯糖		木质素	苯丙烷	25
	甘露糖		果胶	糖醛酸	5

在细菌、酵母菌和真菌中都能找到发酵戊糖的微生物，如柄状毕赤酵母（*Pichia stipitis*）、假丝酵母（*Candida shehatae*）和管囊酵母（*Pachysolen tannophilus*）是最有希望的天然存在的微生物。已经知道只有少数几种细菌确实具有重要的 PDC-ADH 途径生产乙醇。其中运动发酵单胞菌（*Zymomonas mobilis*）具有最活泼的 PDC-ADH 系统；然而它不能异化分解戊糖。近几年来，应用代谢工程得到重组细菌（Alterhum and Ingram，1989；Feldmann et al，1989；Ingram et al，1987；Ohta et al，1991a，b；Tolan and Finn，1987a，b）和重组酵母菌（Hallborn et al，1991；Kötter et al，1990；Tantirungkij et al，1993）作为适宜的乙醇生产菌。最近的研究在富含木糖的玉米芯水解物中比较了各种乙醇生产菌（包括野生菌和重组菌）的性能，结果表明重组乙醇基因的大肠杆菌 KO11（*Escherichia coli* KO11）［大肠杆菌上载有整合到染色体上的运动发酵单胞菌（*Z. mobilis*）的 *pdc* 和 *adhB* 基因］是目前最好的乙醇发酵微生物（Hahn-Hägerdal et al，1993）。

最初的研究在改变发酵代谢途径方面仅仅是部分成功，如以下菌种：菊欧文氏菌（*Erwinia chrysanthemi*）（Tolan and Finn，1987a，b），克雷伯氏杆菌（*Klebsiella planticola*）（Tolan and Finn，1987a，b）和大肠杆菌（*E. coli*）（Brau and Sahm，1986）。第一代重组生物体仅仅增强了 PDC 活性，并且是依赖于 ADH 活性的内源水平以进一步耦合乙醛还原反应和 NADH 氧化反应（见图 6.2）。由于乙醇仅仅是由这些肠道细菌正常产生的若干发酵

产品之一，ADH 活性缺乏与 NADH 积累共同导致多种不希望的副产物形成。这个问题是由增加 ADH 活性的方法解决的，通过过量表达 *Z. mobilis adhB* 基因，产生大肠杆菌（Ingram et al，1987）与克雷伯氏属（*K. oxytoca*）的重组体（Ohta et al，1991a，b；Wood and Ingram，1992），它能有效地发酵多种糖生产乙醇。这是通过将 *Z. mobilis* 基因（*pdc* 与 *adhB*）装配在一个人工操纵子上，产生一个可携带的用于乙醇生产的遗传因子（PET 操纵子）来完成的。大肠杆菌是一种便利的宿主菌，尤其是因为它能在范围很广的碳源（包括五碳糖）上有效地生长。

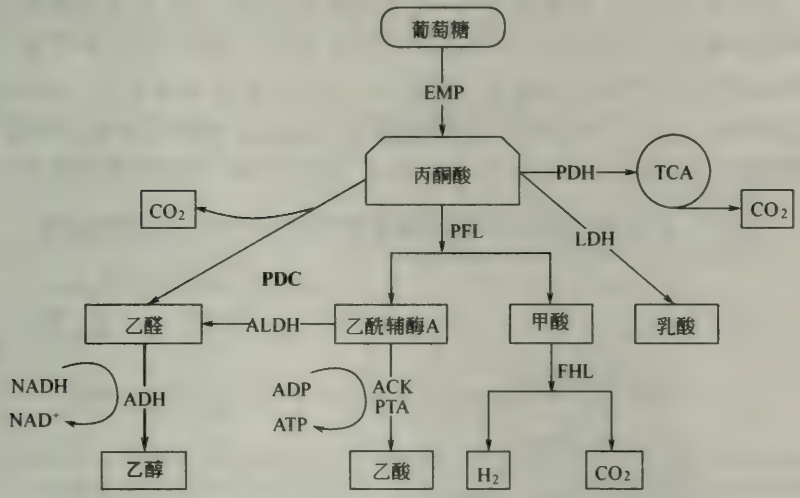


图 6.2　在丙酮酸分支点的竞争性途径

缩写　EMP—糖酵解途径中的酶与中间产物；PDC—丙酮酸脱羧酶；ADH—乙醇脱氢酶；PFL—丙酮酸甲酸裂合酶；ACK/PTA—磷酸转乙酰酶和乙酸激酶；ALDH—乙醛脱氢酶；FHL—甲酸脱氢酶；LDH—乳酸脱氢酶；PDH—丙酮酸脱氢酶

丙酮酸脱羧酶催化丙酮酸的非氧化脱羧化生成乙醛和二氧化碳（见图 6.2）。在大肠杆菌中存在两种乙醇脱氢酶同功酶，在由 NADH 氧化成 NAD^+ 所伴随的发酵过程中，这些酶催化乙醛还原反应生成乙醇。在重组大肠杆菌中，需要把丙酮酸代谢转向乙醇的两种酶［丙酮酸脱氢酶（PDC）与乙醇脱氢酶（ADH）］都以高浓度水平存在着。这种酶的高 PDC 水平与低的表观 K_m 值（见表 6.2）的组合影响是为了丙酮酸有效地把碳流转向乙醇，即使是在像乳酸脱氢酶这样的天然发酵酶存在时也是如此。

表 6.2　比较大肠杆菌和运动发酵单胞菌中作用于丙酮酸的各酶的表观 K_m 值

生　物　体	酶	K_m	
		丙 酮 酸	NADH
大肠杆菌(*E.coli*)	PDH	0.4mmol·L⁻¹	0.18mmol·L⁻¹
	LDH	7.2mmol·L⁻¹	>0.5mmol·L⁻¹
	PFL	2.0mmol·L⁻¹	
	ALDH		50μmol·L⁻¹
	NADH-OX		50μmol·L⁻¹
运动发酵单胞菌(*Z. mobilis*)	PDC	0.4mmol·L⁻¹	
	ADH Ⅱ		12μmol·L⁻¹

注：缩写　PDH—丙酮酸脱氢酶；LDH—乳酸脱氢酶；PFL—丙酮酸甲酸裂合酶；ALDH—乙醛脱氢酶；NADH-OX—NADH 氧化酶；PDC—丙酮酸脱羧酶；ADH Ⅱ—乙醇脱氢酶Ⅱ。

含有 pet 操纵子的重组大肠杆菌在好氧和厌氧条件下都能产生大量的乙醇（见表 6.3）。在好氧条件下，野生型大肠杆菌通过 PDH 和 PFL（K_m 分别为 0.4mmol·L^{-1}和 2.0mmol·L^{-1}，见表 6.3）代谢丙酮酸，主要产品为二氧化碳和乙酸（由过量的乙酰辅酶 A 转化而来）。*Z.mobilis* PDC 的表观 K_m 值类似于 PDH 的 K_m 值，但低于 PFL 和 LDH 的 K_m 值，因此利于乙醛生成。在好氧情况下 NAD^+ 再生主要产生于生物合成以及 NADH 氧化酶（与电子传递系统偶联）。另外，由于 *Z. mobilis* ADH Ⅱ的表观 K_m 值比大肠杆菌 NADH 氧化酶 K_m 值低 4 倍多，所以外源的 ADH Ⅱ能与内源 NADH 库进行有效竞争，因此使得乙醛还原为乙醇。在厌氧情况下，野生型 *E. coli* 主要经 LDH 和 PFL 代谢丙酮酸。如表 6.2 所示，此两种酶的表观 K_m 值分别比 *Z. mobilis* PDC 的 K_m 值大 18 倍和 5 倍。此外，参与 NAD^+ 再生的初级代谢天然酶的表观 K_m 值在 *E. coli* 中也大大高于 *Z. mobilis* ADH 的表观 K_m 值。总的说来，在大肠杆菌中，乙醇基因 *Z. mobilis* 酶的过量表达相应于天然酶系，在打通到乙醇的碳（丙酮酸）和还原力（NADH）通量方面，具有很强的竞争性。

表 6.3　野生型和重组型大肠杆菌在好氧与厌氧生长时发酵产物的比较

生长条件	质　粒	发酵产物/mmol·L^{-1}			
		乙　醇	乳　酸	醋　酸	琥珀酸
好氧	无	0	0.6	55	0.2
	PLO1380-10(PET)	337	1.1	17	4.9
厌氧	无	0.4	22	7	0.9
	PLO1380-10(PET)	482	10	1.2	5.0

注：来自 Ingram and Conway，1988。

1991 年 3 月，佛罗里达大学食品和农业科学院为其创造的设计精巧的微生物获得美国专利（US 5000000）。大量的研究已经报道了大肠杆菌重组菌株的发酵特性。有代表性的最终乙醇质量浓度超过 50g·L^{-1}（例如从 10%葡萄糖和 8%木糖分别得到 54.4g·L^{-1}和 41.6g·L^{-1}）（Ohta et al，1991a，b），与理论最高得率 0.5g 乙醇/g 糖十分接近（葡萄糖→2 乙醇+$2CO_2$）。公开发表的木糖简单分批发酵所得乙醇的体积生产速率与比生产速率分别为 0.6g 乙醇·L^{-1}·h^{-1}和 1.3g 乙醇·g（干重）$^{-1}$·h^{-1}（Alterhum and Ingram，1989）。进一步的改进使乙醇体积生产速率提高到 1.8g 乙醇·L^{-1}·h^{-1}（Ohta et al，1991）。由 *E. coli* KO11 发酵戊糖（如柳木和松木）生产乙醇的成本估计约 0.13 美元/L（von Sivers and Zacchi，1995；von Sivers et al，1994），它很容易使乙醇最终生产成本大大低于 2000 年的目标 0.18 美元·L^{-1}。此外，含乙醇基因的 *E. coli* 除发酵木糖外，还有能力发酵木质纤维素材料的所有其它糖类组分：葡萄糖、甘露糖、阿拉伯糖和半乳糖。当重组菌株在通常存在于半纤维素水解产物的混合糖中生长时，先利用葡萄糖，然后依次利用阿拉伯糖和木糖，乙醇生产接近最高理论得率（Takahashi et al，1994）。

最近，Ohta 等研究 *Z.mobilis* 的 *pdc* 和 *adh* 基因在相关肠细菌产酸克雷伯氏菌（*Klebsiella oxytoca*）中的表达（Ohta et al，1991a，b）。与 *E. coli* 相比，在克雷伯氏菌属菌株中存在着另外两条发酵途径，将丙酮酸转化为琥珀酸和丁二醇（见图 6.2）。正如在 *E. coli* 中一样，该菌可以将 90%以上的碳流从天然发酵途径的糖分解代谢途径转向乙醇生成途径。仅仅重组 PDC 的过量表达产生了至少 2 倍于野生菌的乙醇水平。然而，当在 *K. oxytoca* M5A1 中同时提高 PDC 和 ADH 的表达量时，则乙醇的生产是很快的和很有效的：对于葡萄糖和木糖两种碳源，体积生产能力>2.0g·L^{-1}·h^{-1}，得率 0.5g 乙醇·g^{-1}糖，最终乙醇质

量浓度为 45g·L^{-1}。

6.1.2 氨基酸

氨基酸有着广泛的商业用途，可作为食品添加剂、饲料补充剂、输注物、治疗药剂以及作为肽类或农业化学品的合成前体。大多数微生物具有利用碳和氮源合成所有基本氨基酸的代谢机器（见图 6.3）。某些微生物还可过量生产一种或一组氨基酸。例如 20 世纪 50 年代中期，日本科学家分离出一株能大量分泌 L-谷氨酸的新细菌，开辟了发酵法生产氨基酸的新纪元（Kinoshita et al，1957）。在那以前，氨基酸主要来源是天然蛋白质，少部分由化学合成。这种细菌后来被命名为谷氨酸棒杆菌（*Corynebacterium glutamicum*），是一种革兰氏阳性菌，是好氧短杆菌，能向培养基中分泌大量的谷氨酸，在某些条件下接近 100g·L^{-1}。

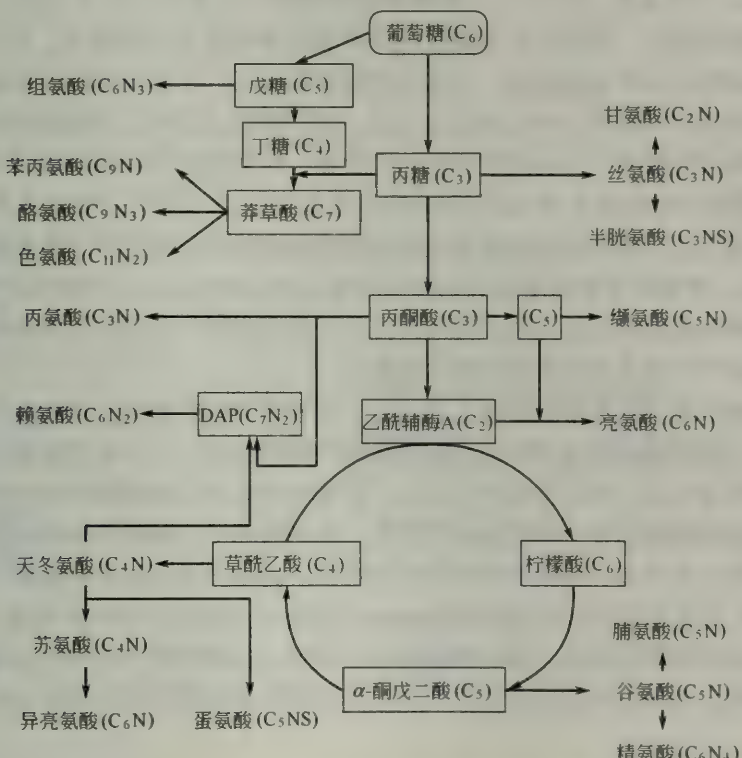


图 6.3 由葡萄糖生物合成氨基酸

DAP—二氨基庚酸

谷氨酸工业生产的成功进一步刺激了人们的兴趣去分离能生产其它氨基酸的菌株。野生型谷氨酸细菌有只能生产几种胞外氨基酸的能力，如谷氨酸、缬氨酸、脯氨酸、谷氨酰胺和丙氨酸。为了所需氨基酸的胞外积累，需要改变细胞代谢和（或）调控。随着这些菌株的发现，多年来人们试着研究诱导营养缺陷型和调节突变型菌株（见例 5.1）。利用营养缺陷型突变株的理论基础是绕过反馈调控（见第 5 章），这可通过使胞内反馈抑制剂或阻遏剂的积累减到最小程度或通过修饰抑制剂结合位点，从而导致酶对抑制剂的存在不敏感。例如，利用精氨酸营养缺陷型突变株可分离得到鸟氨酸生产菌，一年后，又由高丝氨酸营养缺陷型突变菌株分离到成功的赖氨酸发酵生产菌（Kinoshita et al，1957）。目前，大多数氨基酸是通过结合营养缺陷型和调控型的突变菌株而生产的。每年 50 万吨的 L-谷氨酸是用谷氨酸棒杆

菌生产的，同时，它的营养缺陷型突变菌株每年产约 40 万吨 L-赖氨酸。氨基酸的需求仍在不断增长。

鉴于天冬氨酸族氨基酸特别是赖氨酸的商业重要性，为了分离具有优良性能的菌种，开展了强有力的菌种改进计划。最初，这些工作使用了随机变异方式和营养缺陷型选择步骤，该步骤利用了已充分理解的氨基酸生物合成和调控的代谢途径。野生型棒杆菌属由于苏氨酸和赖氨酸协同反馈抑制天冬氨酸激酶而不积累赖氨酸（见 10.1.1 节和图 10.1）。这样，最早的产赖氨酸突变株是高丝氨酸脱氢酶（HDH）缺乏，因而是高丝氨酸营养缺陷型菌株；它不能合成高丝氨酸，故在培养基中需补充高丝氨酸或苏氨酸和蛋氨酸。后者是以一个可控制的速率提供以满足蛋白质合成的需要，同时允许赖氨酸积累到高浓度。进一步改进包括抗 *S*-(2-氨乙基)-L-半胱氨酸（AEC，一种赖氨酸类似物）的菌株。因为 AEC 与赖氨酸类似，它诱导类似的抑制效应，例如天冬氨酸激酶的抑制和赖氨酸合成的阻止。抗 AEC 的菌株中显然含有解除调控的天冬氨酸激酶，此酶不被赖氨酸抑制，因此就能在培养基中积累大量的赖氨酸。接下来的努力集中于中心碳代谢过程，试图将更多的碳从呼吸途径转入回补途径。为此目的，分离出柠檬酸合成酶活性减弱的突变株，并发现赖氨酸收率得到进一步改进，特别是与前面提到的 HDH 缺乏和 AEC 抗性两种表型结合在一起时，情况更是如此。这种方法后来已经应用于具有很多变化的情况：得到氟丙酮酸敏感型突变株（即丙酮酸脱氢酶活性减弱的突变株），丙氨酸营养缺陷型突变菌株和很多其它菌株。由于对随机变异很差的表征，还有对谷氨酸棒杆菌糖回补途径的功能和调控的不完全理解，因此任何声称相应于这些菌株的改进，我们还不知道其改进机制的确切性质。

近年来，通过进一步的途径操作，已获得了更有效的生产菌株，例如通过消除生产菌株降解产物的能力或改善细胞通透性以有助于目标产物的分泌。几个研究组独立启动了集中于棒杆菌属菌种代谢工程工具开发的研究项目。基本的前提是由内源质粒和有效的 DNA 转移系统获得的载体的可利用性。在过去的几年中，在不同的棒杆菌属菌株中已分离出一些小的隐蔽性质粒，并已开发出一些新的有效的转化技术。这就促进了从棒杆菌属中氨基酸生物合成基因的分离，其数量约 50 个［见 Jetten and Sinskey（1995）的评论文章］。这些基因可以单个利用，也可以组合利用，通过提高酶活性或解除关键酶的反馈调节以改进生产菌株。这些基因的使用，也考虑到被用作特异性探针以便阐明氨基酸合成的生物化学及中心碳代谢（CCM）。

色氨酸

在 *E. coli* 中色氨酸合成由一组复杂的反馈机制高度调控。通过一次一个转导每个突变，研究人员在一个单一菌内将一长串改变与这些机理相结合，因此创造了一株色氨酸过量生产菌（Aiba et al，1980；Shio，1986）。芳香族氨基酸合成途径（见图 6.4）的第一步，由 4-磷酸-赤藓糖与 PEP 转化形成 3-脱氧-D-阿拉伯庚酮糖酸-7-磷酸（DAHP），这一步由三个同功酶（AroF、AroG、AroH）催化，此三个酶又分别由酪氨酸、色氨酸和苯丙氨酸所调节。最初的方法之一是通过删除 *aroG* 和 *aroH* 来简化该系统的调控。此外，通过突变（*aroF*394）致使酪氨酸调控的酶（AroF）对反馈抑制不敏感，并且通过失活阻遏物基因（*tyrR*）以消除对该基因的阻遏作用。其它修饰，包括切断产酪氨酸和苯丙氨酸的分支途径（*tyrA* 和 *pheA*）、失活色氨酸酶基因（*tna*）以防止所合成的色氨酸可能的降解、通过使邻氨基苯甲酸合成酶（*trpE*382）对色氨酸不敏感来减弱色氨酸分支途径的反馈抑制、色氨酸阻遏物（*trpR*）的失活、通过突变色氨酰-*t*RNA 合成酶基因（*trpS*）而破坏细胞的衰减控

制。工业用的 *E. coli* 菌株（NST100）在含葡萄糖 5% 培养基中培养 24h 后可产色氨酸 $6.2g\cdot L^{-1}$。在培养基中添加邻氨基苯甲酸有可能提高色氨酸得率。

最近，一株能产 18g 色氨酸$\cdot L^{-1}$的谷氨酸棒杆菌已改为生产大量的酪氨酸（$26g\cdot L^{-1}$），这是通过过量表达解除调控的 3-脱氧-D-阿拉伯庚酮糖酸-7-磷酸（DAHP）合酶与分支酸变位酶而实现的（Ikeda and Katsumata，1992）。在先前的构建中一个额外的基因（预苯酸脱水酶）的过量表达，导致苯丙氨酸占优势的生产（$28g\cdot L^{-1}$）。

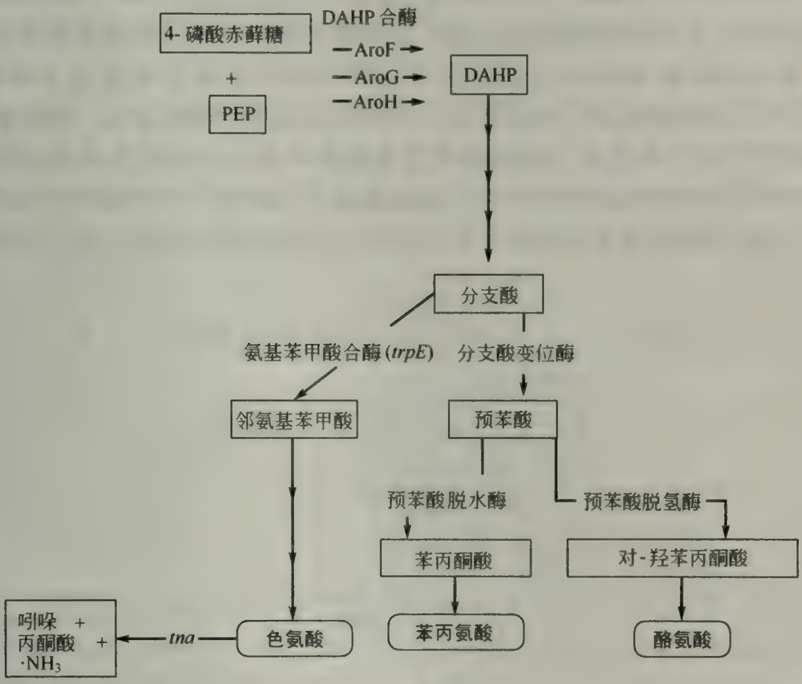


图 6.4 芳香族氨基酸的生物合成

在 *E. coli* 中，结构基因构成一个操纵子（*trpEDCBA*）从属于一个共同的操纵基因。调节基因远离操纵子，通过终产物色氨酸反馈抑制酶的形成（阻遏）

丙氨酸

Uhlenbusch 等人将球形芽孢杆菌（*Bacillus sphaericus*）的丙氨酸脱氢酶（*alaD*）基因引入运动发酵单胞菌（*Z. mobilis*）中，构建了一株丙氨酸高产菌（Uhlenbusch et al，1991），得率为每 280mmol 葡萄糖可生产丙氨酸 10mmol。后来通过添加 $85mmol\cdot L^{-1}$氨使丙氨酸产量提高到 41mmol，可以看出在此之前氨显然是限制条件。在此生产速率下，生长停止了，这也许是由于丙酮酸脱羧酶（PDC）与丙氨酸脱氢酶间对丙酮酸的强烈竞争。使 PDC 辅助因子焦磷酸硫胺素匮乏，结果导致菌株生长进一步受到抑制，而使丙氨酸产量提高（25h 内达 84mmol）。

苏氨酸

虽然，赖氨酸和蛋氨酸能被经济地生产用作饲料添加剂，而苏氨酸由于现有工艺得率太低而不能满足需要。然而，最近通过代谢工程构建有效的苏氨酸生产菌的工作取得重大进展。通过 *E. coli thrB* 突变株的互补，编码苏氨酸途径前两步酶的谷氨酸棒杆菌基因被分离出来，这两种酶分别是高丝氨酸脱氢酶（HD）和高丝氨酸激酶（HK）（Follettie et al，

1988)。这两种基因形成一个操纵子，它是从 *hom* 基因的一个单一启动子上游被表达的(Peoples et al，1988)，*hom* 基因是由蛋氨酸经一独特的衰减体系在转录水平上进行调节的(Jetten et al，1993)。苏氨酸合成途径的最后一步包括通过组成型酶苏氨酸合酶（TS）将磷酸高丝氨酸转化为苏氨酸。最近，通过谷氨酸棒杆菌营养缺陷菌株的互补得到了编码 TS（*thrC*）的基因（Han et al，1990）。

苏氨酸生产是由共同底物 L-天冬氨酸-β-半醛（ASA）到两个分支途径（苏氨酸生物合成途径和赖氨酸生物合成途径）的代谢通量分布决定的（见图6.5）。该通量的分布由竞争性酶对共同底物 ASA 的相对亲和力所控制，竞争性的酶为高丝氨酸脱氢酶和二氢吡啶二羧酸合成酶。由于高丝氨酸脱氢酶的活性对 L-苏氨酸的别构抑制效应十分敏感（K_i = 0.16mmol·L^{-1}），因此在名义生长条件下，ASA 优先进入赖氨酸途径。理解高丝氨酸脱氢酶对苏氨酸抑制的分子基础的关键和构建苏氨酸高产菌的关键是分离抗反馈抑制的 HD (HD^{dr})。有两个研究组独自分离并表征了编码去除了调控的、抗反馈的高丝氨酸脱氢酶基因（Archer et al，1991；Reinscheid et al，1991）。Archer 等（1991）确定了 *hom*^{dr} 突变型

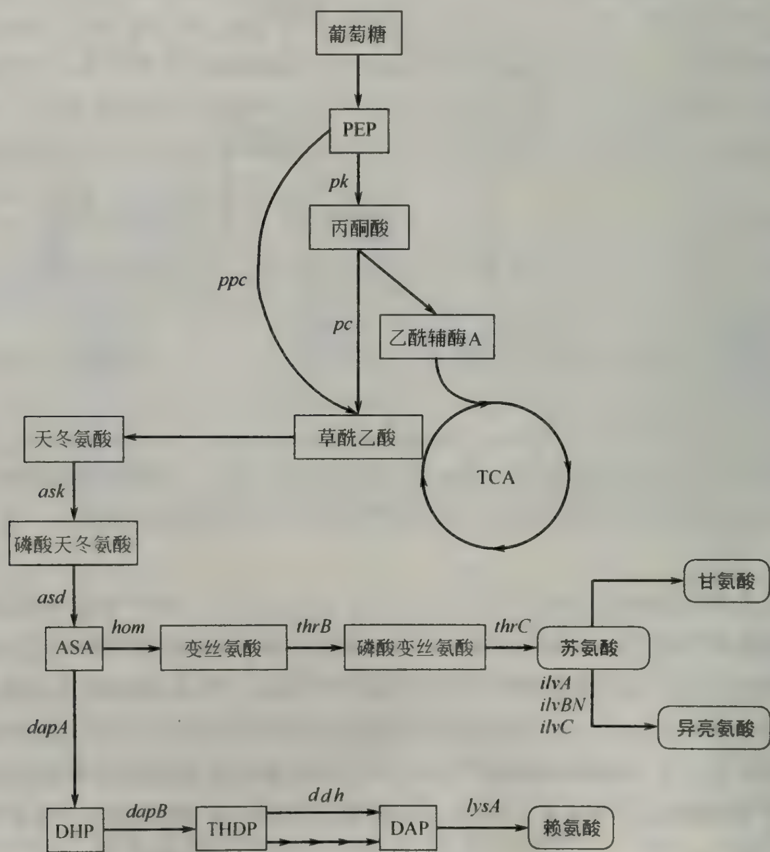


图 6.5 天冬氨酸家族氨基酸的生物合成途径

缩写 DHP—2,3-二氢吡啶-2,6-二羧酸；THDP—四氢吡啶二羧酸；*ppc*—磷酸烯醇丙酮酸羧化酶；*pc*—丙酮酸羧化酶；*pk*—丙酮酸激酶；*ask*—天冬氨酸激酶；*asd*—ASA 脱氢酶；*dapA*—DHP 合酶；*dapB*—DHP 还原酶；*ddh*—DAP 脱氢酶；*lysA*—DHP 脱羧酶；*hom*—高丝氨酸脱氢酶；*thrB*—高丝氨酸激酶；*thrC*—苏氨酸合酶；*ilvA*—苏氨酸脱水酶（脱氨基酶）；*ilvBN*—乙酰羟酸合成酶，乙酰羟酸同分异构还原酶，二羟酸脱水酶；*ilvC*—转氨酶 C

是由于一个碱基缺失，这从根本上改变了羧基末端结构，导致相对于野生型菌来说有 10 个氨基酸发生改变以及最后 7 个残基的缺失。这些残基显然是苏氨酸结合位点的一部分，它们从 HD^{dr}突变株中的去除致使 HD 酶活性对苏氨酸的反馈抑制不敏感。

为了研究 ASA 节点处碳通量的调控，构建了意义明确的重组菌株（Colon et al，1993；Eikmanns et al，1991；Reinscheid et al，1994）。苏氨酸基因在野生型谷氨酸棒杆菌 13032 中的扩增并没有产生任何苏氨酸的分泌，这也许是由于苏氨酸对天冬氨酸激酶和高丝氨酸脱氢酶的反馈抑制（Eikmanns et al，1991）。仅仅去除调控的 hom^{dr}（质粒 pJD4，见表 6.4）的扩增，在赖氨酸和苏氨酸途径之间产生了近似相等的通量分配以及苏氨酸（100mmol·L^{-1}）和高丝氨酸（74mmol·L^{-1}）的胞内积累，其导致如下结论：苏氨酸的生产可能是由于其流出量和（或）HD 与 HK 活力之间没有平衡而受到限制。为防止胞内高丝氨酸的积累，Colón 等将 *thrB* 基因与 tac 启动基因（质粒 pGC42，见表 6.4）融合，并通过添加 IPTG 调控 hom^{dr}/*Ptac-thrB* 的表达（Colón et al，1993；Colón et al，1995a，b）。通过提高高丝氨酸激酶相对于高丝氨酸脱氢酶的活性，基本上消除了高丝氨酸的分泌，最终苏氨酸滴度（或效价）提高约 120%（见表 6.4）。

表 6.4 用重组谷氨酸棒杆菌（*C. glutamicum*）生产苏氨酸①

谷氨酸棒杆菌（*C. glutamicum*）	分泌的氨基酸/g·L^{-1}				
	赖氨酸	苏氨酸	高丝氨酸	甘氨酸	异亮氨酸
ATCC 21799(pM2)②	22.0±1.0	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1
ATCC 21799(pJD4)	4.5±0.2	5.4±0.2	2.0±0.1	2.0±0.1	1.3±0.1
ATCC 21799(pGC42)③					
没有诱导	0.9±0.1	5.6±0.3	6.7±0.3	1.3±0.1	1.0±0.1
1.5mmol IPTG	0.9±0.1	11.8±0.6	<0.1	4.6±0.2	1.9±0.2

① 取自 Colon et al，1995a，b。

② *E. coli-C. glutamicum* 穿梭载体；pJD4，Km^R hom^{dr}-*thrB* 操纵子；pGC42，Km^R Ap^R *laqI*^{q} hom^{dr} *tac-thrB*。

③ ATCC 21799（pGC42）由适量已给的 IPTG 所诱导。

表 6.4 表明，大部分的苏氨酸或转化为异亮氨酸，或进一步降解为甘氨酸。经标记物交换诱变法（marker exchange mutagenesis）构建意义明确的 *ilvA* 突变株，防止了苏氨酸向异亮氨酸的转变（Colón et al，1997）。对此，重点放在阻断苏氨酸进一步降解为甘氨酸。这是一个更具挑战性的难题，其包括多于一条途径，这些基因在棒状杆菌中尚未被表征。

异亮氨酸

谷氨酸棒杆菌（*C. glutamicum*）中异亮氨酸的生物合成是从 L-苏氨酸经 L-苏氨酸脱氨基酶（LTD，*ilvA*）催化转化为 α-酮基丁酸开始的，然后由乙酰羟酸合酶（AHAS，*ilvB-ilvN*）催化 α-酮基丁酸与 α-乙酰乳酸的缩合。此代谢途径也为另外两条支链氨基酸（BCAA）即缬氨酸和亮氨酸的合成提供前体物。尽管有报道称在肠道细菌中存在 5 种不同的 AHAS 同功酶，但在 *C. glutamicum* 中只知道有一种。LTD 和 AHAS 二者均受异亮氨酸的抑制，而 AHAS 还受亮氨酸与缬氨酸的抑制。此外，这三种 BCAA 都抑制 AHAS 的基因表达。在棒状菌属中参与 BACC 生物合成的基因识别与表征是在最近几年集中研究的主题（Colón et al，1995；Cordes et al，1992；Keilhauer et al，1993）。

通过与质粒 pGC42 的 hom^{dr}与 *thrB* 基因组合及 *ilvA* 基因（质粒 pGC77，见表 6.5）的扩增，可以实现异亮氨酸过量生产（见苏氨酸情况）。编码苏氨酸脱水酶的棒杆菌 *ilvA* 基因通过一株 *E. coli ilvA* 突变株的异源补充，从一个基于 pM2 的谷氨酸棒杆菌基因组文

库中分离得到。所产生的质粒（pGC77），当插入赖氨酸菌株（ATCC 21799）时，生产异亮氨酸约 15g·L^{-1}，同时也有少量的赖氨酸和甘氨酸生成。碳平衡表明先前转化到苏氨酸、赖氨酸、甘氨酸和异亮氨酸的大部分碳（菌株 21799/pGC42）现在通过新菌株（21799/pGC77）结合进异亮氨酸中。

表 6.5 重组谷氨酸棒杆菌（*C. glutamicum*）生产异亮氨酸①

谷氨酸棒杆菌（*C. glutamicum*）	分泌的氨基酸/g·L^{-1}				
	赖氨酸	苏氨酸	高丝氨酸	甘氨酸	异亮氨酸
ATCC 21799(pM2)	22.0±1.0	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1
ATCC 21799(pGC42)	0.9±0.1	11.8±0.6	<0.1	4.6±0.2	1.9±0.2
ATCC 21799(pGC77)②	0.4±0.1	<0.1	<0.1	0.5±0.1	15.1±0.2

① 取自 Colón et al，1995。

② 由 pGC42（见表 6.4）Km^R Ap^R *laqI*^{q} *hom*^{dr} *ilvA tac-thrB* 派生。

6.1.3 溶剂

丙酮、丁醇和乙醇（ABE）工业发酵生产史可追溯到 20 世纪初。由于缺乏天然橡胶，英国商行 Strange 和 Graham 调查了生产合成橡胶的可能性。后来确定合成橡胶的前体丁二烯和异戊二烯可由丁醇或异戊醇成功生产出来。正是在此形势下，Perkins 教授和他的助手 Chaim Weizmann（后来他成为以色列第一任总统）被招募来研究橡胶前体的化学生产。尽管 Weizmann 是学化学的，但他不久便得出结论：这一过程成功的关键是通过发酵，于是他将自己再教育成为一名微生物学家。在 1912～1914 年间，他筛选了几株细菌菌株并从中成功分离出一株菌，最初称为 BY，后被称为丙酮丁醇梭菌（*Clostridium acetobutylicum*），该菌由淀粉生产可使丙酮和丁醇的得率最高。

由于第一次世界大战的爆发，作为硝化纤维素胶体溶剂的丙酮需求量大增，使 ABE 发酵过程的发展加速进行。第二次世界大战导致丙酮需求量进一步增长，发酵底物从玉米改为糖蜜，因为在 20 世纪 30 年代这种原料丰富廉价。第二次世界大战后，ABE 发酵业开始衰退而且在美国和英国实际上已停止生产，这是因为出现由石油生产的溶剂，且糖蜜价格不断上涨。

ABE 发酵过程的衰亡是由于一些自身系统的限制造成的：如终产物浓度、得率和生产能力都很低，不合适的溶剂比，相对高的原料成本等。微生物溶剂生产菌的基因工程可潜在地振兴 ABE 发酵过程，这需强调如下挑战：

- 提高产品收率，并以木质纤维素或废弃原料作为底物；
- 开发在连续和固定化细胞系统展现高生产能力的菌株；
- 开发最终产物浓度高且增强了对最终产物耐受性的菌种；
- 开发容易调节溶剂比例的菌种。

在溶剂形成的开始，几种溶剂基因酶的诱导表明溶剂形成的基因控制是非常重要的（Bennett and Rudolph，1995；Sauer and Duerre，1995）。然而，尽管与几种酸及溶剂有关的基因已经克隆和测序，但代谢通量调控机制的理解仍然是很困难的。已为一些梭菌菌株开发出一些遗传工具，例如质粒载体。其中包括：（1）克隆运载体，利用与大范围宿主结合的粪肠球菌（*Enterococcus faecalis*）的 pAMβ1 复制子，或枯草芽孢杆菌（*Bacillus subtilis*）的 pIM13 复制子；（2）合适的选择标记物是红霉素或 clarinthromycin，其在低的通用的 pH 中是稳定的；（3）在表达载体构建中已经开发利用了高度表达的梭状芽孢杆菌属（*Clostridium*）铁氧还原蛋白启动基因；（4）结合转座子 Tn916、Tn925 和 Tn1545 在梭菌中起作用，

因此转座子突变是可能的。大量的梭菌基因在 *E. coli* 中已被克隆和研究（Bennett and Rudolph，1995；Durre et al，1995；Papoutsakis and Bennett，1991），等候用于梭菌的基因-失活生理研究中。

丙酮丁醇梭菌（*C. acetobutylicum*）中酸和溶剂形成基因首次成功克隆是 1992 年报道的，其用于菌种 ATTC 824 中乙酰乙酸脱羧酶（*adc*）和磷酸转丁酰酶（*ptb*）的异源过量表达（Mermelstein et al，1992）（见图 2.8）。随着 *B. subtilis*/*C. acetobutylicum* 穿梭载体（pFNK1）的发展，连同一个改进了的电转化方案，做到这一点是可能的。乙酰乙酸脱羧酶（AADC）是丙酮生产途径中的末端酶，它把乙酰乙酸转化为丙酮和 CO_2。磷酸转丁酰酶（PTB）是丁酸生产的分支点酶，把丁酰辅酶 A 与无机磷酸转化成丁酰磷酸（随后再由丁酸激酶转化成丁酸）和还原辅酶 A。或以另外的方式，丁酰辅酶 A 经两步酶催化过程转化为丁醇。重组菌中 AADC 活力在指数期提高 9 倍多，在稳定期提高了 33 倍多，而工程菌 PTB 活力在指数期提高 20 多倍，稳定期提高 40 多倍。经转化的菌株表明了丙酮、丁醇、乙醇的水平分别提高 95%、37% 和 90%。此外，工程菌中发酵终点的酸浓度比对照组低得多（低 22 倍），而且重新设计的菌种由葡萄糖为原料的溶剂收率提高约 50%。

在一不同的研究中，通过改变 *C. acetobutylicum* NCIMB 8052 的底物范围，证明了在梭菌中遗传操作的可行性：将含有取自 *C. acetobutylicum* 的 *celC* 和 *celA* 基因的人工操纵子转移到 NCIMB 8052 菌株中，产生的转化体能以地衣淀粉（一种 β-聚糖）作为惟一碳源进行生长。

1,3-丙二醇

1,3-丙二醇（1,3-PD）是化学和聚合物合成中的一个中间物，例如在聚氨酯与聚酯的合成中。其目前由石油生产，而且相对于类似的二醇，其生产成本十分昂贵。Tong 等（1991）最近构建了一株 *E. coli* 丙二醇生产菌，它携带着来自肺炎克雷伯氏菌（*Klebsiella pneumoniae*）*dha* 调节子的基因。在肺炎克雷伯氏菌中的 *dha* 调节子能使菌体在甘油培养基上厌氧生长并产生 1,3-PD。*E. coli* 中不含有 *dha* 系统，如果没有一个外源电子受体，其不能在甘油培养基上厌氧生长，也不产生1,3-PD。在第一步（见图6.6），甘油在以 B_{12} 为辅

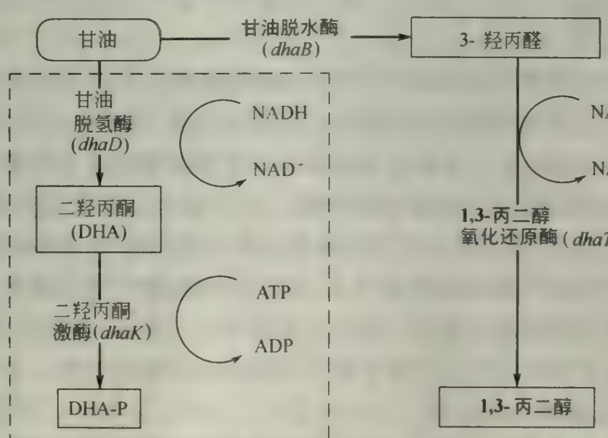


图 6.6　甘油在 *K. pneumoniae* 中的异化途径

在 *E. coli* 中 *K. pneumoniae* 的 *dhaB* 和 *dhaT* 基因的克隆得到一株重组菌，

其能将甘油转化为工业上有用的产品 1,3-丙二醇

DHA-P—磷酸二羟丙酮

酶的脱水酶作用下转化为3-羟基丙醛，然后在以NAD为辅助因子的氧化还原酶作用下还原为1,3-丙二醇。

在*E. coli* AG1中构建的*K. pneumoniae* ATCC 25955基因组文库，增加了在甘油和二羟丙酮上厌氧生长的能力，并筛选用于1,3-丙二醇的生产。从产1,3-丙二醇的*E. coli*菌株中分离到黏粒pTC1，并发现它具有与*dha*调节子的四个基因相关的酶催化活性：甘油脱水酶（*dhaB*），1,3-丙二醇氧化还原酶（*dhaT*），甘油脱氢酶（*dhaD*）和二羟丙酮激酶（*dhaK*）（见图6.6）。这四种酶的活性均可通过甘油的存在而诱导。当*E. coli* AG1/pTC1在复合培养基加甘油上生长时，1,3-丙二醇对甘油的得率为$0.46mol \cdot mol^{-1}$。主要的发酵副产物是甲酸、乙酸和D-乳酸。1,3-丙二醇发酵为研究一个外源宿主中生化途径的相互作用及为代谢途径工程发展策略提供了一个有用的模型系统。

该领域还需进一步发展以满足最小化副产物形成、消除甘油补充的需要，还要扩大底物范围到丰富的可再生物质。最大理论收率为0.875mol 1,3-PD/mol甘油，这一结果表明收率还能提高。由于需要还原力的再生，因此没有一种微生物能将甘油全部转化为1,3-PD和CO_2。细胞通过形成一个副产物混合物（如乙酸、甲酸等）而使还原力（NADH）再生，因此实质上将最大理论得率降至$0.667mol \cdot mol^{-1}$。原则上，有可能用戊糖或己糖补充甘油发酵以提供还原力的另一个来源。这些过程的理论得率（每摩尔甘油可得1,3-PD的量，以摩尔计）概括如下（Tong and Cameron，1992）：

$$-2\text{glycerol}-\text{glucose}+2\ 1,3\text{-PD}+2\text{acetate}+2\text{formate}=0\quad(\text{理论得率}=1.0mol \cdot mol^{-1})$$

（甘油） （葡萄糖） （乙酸） （甲酸）

$$-5\text{glycerol}-3\text{xylose}+5\ 1,3\text{-PD}+5\text{acetate}+5\text{formate}=0\quad(\text{理论得率}=1.0mol \cdot mol^{-1})$$

（木糖）

用携带有*K. pneumoniae dha*调节子的*E. coli*菌株进行中试，在加有共同底物的甘油中生长，确实提高了1,3-PD收率：仅甘油为底物，收率为$0.46mol \cdot mol^{-1}$；甘油+葡萄糖为底物，收率为$0.63mol \cdot mol^{-1}$；甘油+木糖为底物，收率为$0.55mol \cdot mol^{-1}$。这些提高在经济上是十分重要的，因为葡萄糖和木糖的价格明显低于甘油的价格。

6.2 扩大底物范围

该领域的大部分工作集中于工程菌以便利用木糖和乳糖，木糖是半纤维素生物质中的主要五碳糖，乳糖是乳品工业主要副产品，其它一些努力考虑了另外一些丰富的碳源如乳清、淀粉和纤维素的利用。一般说来，微生物菌种利用一系列碳能源能力的扩大提供了在设计中增加的适应性，并改进了发酵过程的经济可行性。这一点对一些大宗产品生产来说特别重要，因其底物费用在总生产成本中占了相当大比例（对乙醇约占60%～65%，赖氨酸40%～45%，抗生素和工业用酶25%～35%）。由于大多数微生物分享大量共同代谢途径，因此扩大底物范围通常只需添加少数几个酶反应步骤即可。然而，有时这些步骤需要与下游反应协调，而且正是在这种情况下，代谢工程工具确实是非常有用的。

6.2.1 戊糖代谢生产乙醇的代谢工程

在向肠细菌中引入乙醇基因的同时，类似的工作也在着手进行，以便在乙醇生产野生菌*S. cerevisiae*和*Z. mobilis*中构建组成戊糖代谢途径。通常，微生物经两条独立路线将木糖代谢为木酮糖（见图6.7）。由木糖异构酶所催化的一步途径在细菌中是很典型的，而包括木糖还原酶和木糖醇脱氢酶的两步反应通常存在于酵母中。木酮糖接着被ATP磷酸化，

经戊糖磷酸途径和 EMP（糖酵解）途径（或 ED 途径，如 *Z. mobilis* 等菌体中）发生分解代谢。最近几年，编码木糖利用酶的基因已在 *E. coli* 和其它一些细菌中被克隆和表征（Lawlis et al，1984；Rygus et al，1991）。分离能利用木糖的野生乙醇基因微生物的努力还没有取得成功，这些为向生物体导入木糖利用基因提供了原动力。这些生物体主要是用于乙醇生产，这样就会有高的乙醇抗性的优点。

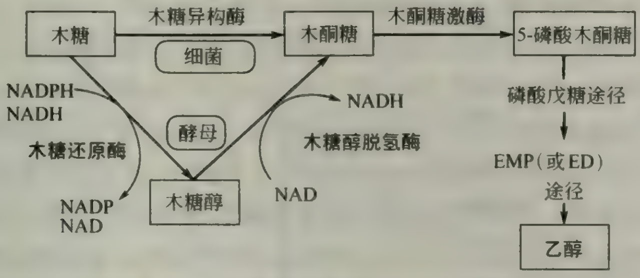


图 6.7　在细菌和酵母中的木糖代谢

酵母

尽管某些类型的酵母，例如 *Pachysolen tannophilus*、柄状毕赤酵母（*Pichia stipitis*）或 *Candida shehatae* 等酵母菌可以发酵木糖，但是与 *S. cerevisiae* 等普通的发酵葡萄糖的酵母相比，它们的乙醇得率很低且乙醇耐受力也很低。最初，试图在 *S. cerevisiae* 中克隆来自 *E. coli*（Sarthy et al，1987）或 *B. subtilis*（Hollenberg and Sahm，1988）的木糖异构酶基因，以引入一步木糖代谢途径，结果由于在重组宿主细胞中异源蛋白质的失活都没能成功。

在大部分酵母菌和真菌中，木糖还原酶和木糖醇脱氢酶分别依赖于 NADPH 和 NAD（图 6.8）。然而，有这样的一些例子，酵母木糖还原酶（例如来自 *P. stipitis* 和 *C. shehatae*）具有双重辅酶特异性（即 NADPH 与 NADH）。这种类型的酶有防止 NAD/NADH 氧化还原系统不平衡的优势，尤其是在限制氧的情况下。最近，*P. stipitis* 中对于木糖还原酶和木糖醇脱氢酶的基因被导入 *S. cerevisiae*（菌株 H）中（Kötter et al，1990；Tantirungkij et al，1993）。尽管 *P. stipitis* 在厌氧条件下将木糖主要转化为乙醇，但重组菌 *S. cerevisiae*（菌株 H）的乙醇生产处于很低的边缘（$2.7g \cdot L^{-1}$），伴随着大量的木糖醇的累积（$35g \cdot L^{-1}$）。观察到好氧条件下乙醇得率和生产能力较高，这可解释为改进了 NAD 从 NADH 的再生，进而刺激了木糖醇脱氢酶。在 *S. cerevisiae* 中木糖利用能力附加的限制也归因于非氧化 PPP 的低效无能，如 7-磷酸-景天庚酮糖的积累所显示。

试图对细胞经随机突变和菌种筛选来进一步改进菌株 H，使所说的细胞能在木糖培养基上迅速生长（Tantirungkij et al，1994）。有趣的是，菌株 IM2 在木糖培养基中生长速率比菌株 H 快 3 倍，这表明了木糖还原酶和木糖醇脱氢酶二者的活力都很低，但木酮糖激酶的比活性高 1.5 倍。然而，尽管较高的生长速率，但菌株 IM2 乙醇生产勉强改进到 $4.2g \cdot L^{-1}$，收率为 $0.08g \cdot g^{-1}$。

运动发酵单胞菌（*Zymomonas mobilis*）

对于乙醇生产菌 *Z. mobilis* 来说，木糖也会是一种有用的碳源。运动发酵单胞菌是一种杆菌，是生产含酒精饮料的天然发酵剂，已经表明其乙醇生产能力高于酵母。总之，这表现出作为生产乙醇的理想催化剂所尝试的很多所希望的特性，例如高的乙醇得率、选择性和比生产能力、对低 pH 值和高乙醇浓度耐受力强等。在葡萄糖培养基中，*Z. mobilis* 产乙醇水平至少可达12%（w/v），得率高达理论值的97%。与酵母相比，*Z. mobilis* 展现收率

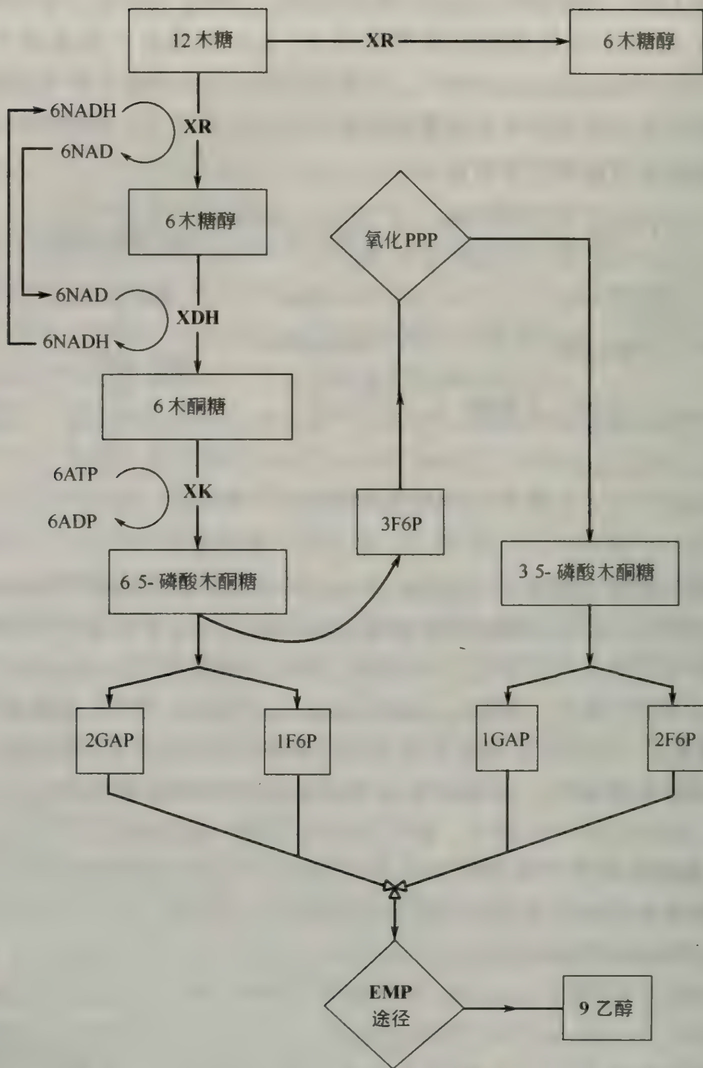


图 6.8　重组菌 *S. cerevisiae* 中厌氧木糖利用与辅助因子的再生

缩写：EMP—糖酵解途径；PPP—戊糖磷酸途径；XR—木糖还原酶；XDH—木糖醇脱氢酶；XK- 木酮糖激酶；GAP—3-磷酸甘油醛；F6P—6-磷酸果糖

高出 5%～10%，体积生产能力大于 5 倍。该菌引人注目的高得率归因于发酵期间减少了生物菌体的形成，其显然受 ATP 可利用性的限制。注意，该菌经 ED 途径［见反应式（2.6）和方框 6.1］每摩尔葡萄糖仅产生 1mol ATP，而酵母菌（EMP 途径）每摩尔葡萄糖产 2mol ATP。事实上，发酵单胞菌属是至今惟一被确认为仅限于厌氧利用 ED 途径的菌属。此外，葡萄糖能以促进扩散方式很容易地穿过细胞膜，被高度活跃的丙酮酸脱羧酶/乙醇脱氢酶系统有效地转化为乙醇。该菌属被公认为是一种安全（GRAS）微生物而用作动物饲料。正如前面所述，此微生物的主要缺陷是它只能利用葡萄糖、果糖和蔗糖，因此不能发酵可广泛利用的戊糖。

上述情况导致美国国家再生能源实验室（Golden ，CO）的 Zhang 等人试图在 *Z. mobilis* 中引入一条戊糖代谢途径（Zhang et al，1995）。早期其它一些研究组尝试用取自克

雷伯氏菌（*Klebsiella*）或黄单胞菌（*Xanthomonas*）的木糖异构酶（*xylA*）和木酮糖激酶（*xylB*）基因（见图 6.7），尽管这些基因能在 *Z. mobilis* 中进行功能性表达，但并没有真正成功。后来不久就清楚了，这些失败是由于在 *Z. mobilis* 中不存在可觉察的转酮糖酶和转醛糖酶的活性，而这些酶活性对完成一条功能性戊糖代谢途径是必要的（见图 6.9）。在克隆了 *E. coli* 转酮糖酶基因并将其引入 *Z. mobilis* 之后，小部分木糖转化成了 CO_2 和乙醇（Feldmann et al，1992）。下一步是要引入转醛糖酶反应，因为该菌体胞内积累了大量的 7-磷酸-景天庚酮糖。应用精密的克隆技术构建一个携带有两个独立操纵子的嵌合型穿梭载体（pZB5）：其中一个操纵子编码 *E. coli xylA* 和 *xylB* 基因，另一个表达 *E. coli* 转酮糖酶（*tktA*）和转醛糖酶（*tal*）的基因。含有 4 个木糖同化和无氧化性的磷酸戊糖途径基因的两个操纵子成功地在 *Z. mobilis* CP4 中进行表达，该重组菌有能力在以木糖为惟一碳源的培养基上快速生长，而且可有效地将葡萄糖和木糖转化为乙醇，对木糖和葡萄糖的得率分别可达理论值的 86% 和 94%。对前面所讨论的在 *E. coli* 中表达 *Z. mobilis* PET 操纵子生产乙醇来说是一个互补的方法。

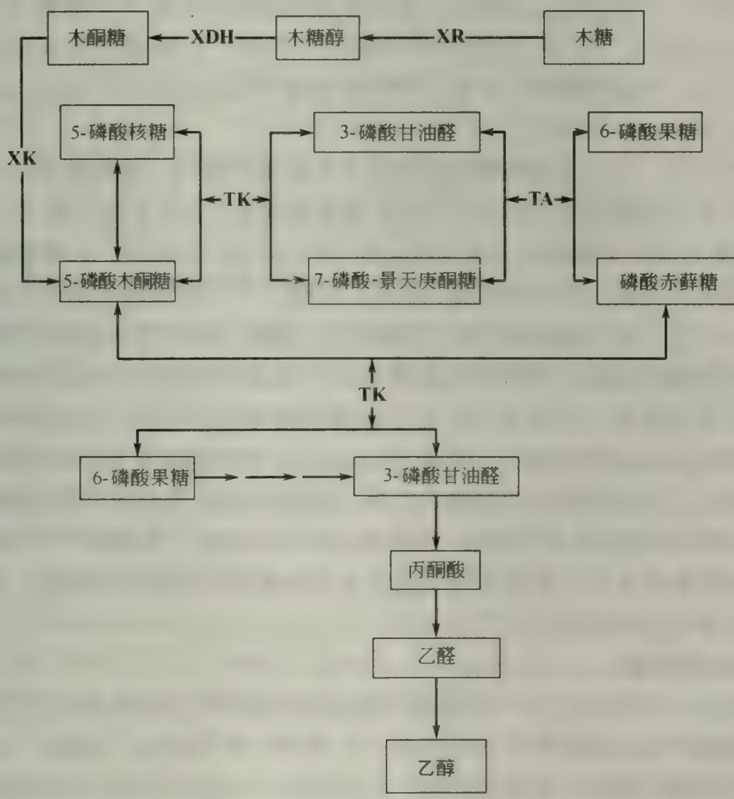


图 6.9　用代谢工程菌 *Z. mobilis* 由戊糖生产乙醇

缩写：XR—木糖还原酶；XDH—木糖醇脱氢酶；TK—转酮糖酶；TA—转醛糖酶

方框 6.1　重组发酵单胞菌株基于木糖的理论乙醇得率

此重组菌中乙醇生产的化学计量学（见图 6.8）可总结如下［忽略 NAD（P）H 的平衡］：

$$3\ \text{木糖} + 3ADP + 3P_i \rightarrow 5\ \text{乙醇} + 5CO_2 + 3ATP + 3H_2O$$

于是，乙醇理论得率为 0.51g 乙醇·g^{-1}木糖（1.67mol·mol^{-1}）。值得重视的是经过代谢工程的途径从 1mol 木糖仅生成 1mol ATP，与通过戊糖磷酸和 EMP 两条途径的组合相比，后者 1mol 木糖可生成 5/3mol ATP。能量限制导致形成较少的生物菌体量，进而使底物向产物有效地转化。

6.2.2 纤维素-半纤维素解聚作用

如果能利用木质纤维素生产乙醇的微生物也有能力利用纤维素、半纤维素及相关的碳水化合物，这会是非常吸引人的。许多植物致病菌（软-腐细菌）例如胡萝卜软腐欧文氏菌（*Erwinia carotovora*）和菊欧文氏菌（*Erwinia chrysanthemi*）已经进化有复杂精密的水解酶和裂解酶系。该酶系有助于木质纤维素的增溶，允许它们浸软并渗入植物组织（Kado，1992)。这些细菌的基因工程用于生产乙醇是一个有吸引力的选择，它可取代化学法或酶法对木质纤维素生物质的增溶。用 PET 操纵子对 *E. carotovora* SR38 和 *E. chrysanthemi* EC16 进行基因工程，结果表明可从纤维二糖、葡萄糖和木糖高效地生产乙醇和 CO_2 作为初级发酵产物（Beall and Ingram，1993)。这两种含乙醇基因的欧文氏菌属（*Erwinia*）菌株在 48h 以内可由 100g·L^{-1}纤维二糖生产约 50g·L^{-1}乙醇，乙醇最大体积生产能力达 1.5g·L^{-1}·h^{-1}。此速率是所报道的利用纤维二糖的酵母菌 *Brettanomyces custersii* 生产乙醇速率的两倍多（Spindler et al，1992)。

沿着类似的路线，也尝试着将糖化特性导入乙醇生产菌中。从嗜热菌 *C. thermocellum* 中获得的编码木聚糖酶的基因（*xynZ*），在乙醇基因菌 *E. coli* KO11 和 *K. oxytoca* M5A1 (pLO1555) 高细胞质水平被表达（Burchhardt & Ingram，1992)。木聚糖酶是一种热稳定酶，它将木聚糖解聚为其主要的单体物（99%)-木糖。为了增加培养基中木聚糖酶的量，以利于木聚糖水解，在一个二级循环过程中使用单一基因工程菌进行高分子原料发酵生产乙醇，收集含木聚糖酶的细胞，并将它们加到 60℃ 的木聚糖溶液中，从而从细胞中溶解并释放出木聚糖酶以进行糖化。冷却至 30℃ 后，水解物发酵生产乙醇，与此同时，再补充木聚糖酶以进一步糖化。在这种应用中，发现 *K. oxytoca* 是一株优良菌，因为除木糖（*E. coli* 可代谢的）之外，它也能消耗木二糖和木三糖。尽管 M5A1（pLO1555）的最大理论得率超过了 48g·L^{-1}乙醇/(100g·L^{-1}) 木糖，但是该过程只达到最大得率的 1/3，因为该菌体不能代谢木四糖和更长的低聚物。得率显然是由工业木聚糖的可消化性所限制，而不是由于木聚糖酶活性的缺乏及乙醇的毒性。

6.2.3 乳糖和乳清利用

乳清（WHEY）是乳品工业一种营养丰富的副产物，它可为生物工艺过程提供廉价的碳源和氮源。乳清中含大量乳糖（干重的 75%）和蛋白质（12%～14%），还含有少量有机酸、矿物质和维生素，其年产量达 10^{11}kg。虽然乳清中的蛋白质经分离浓缩用于食品（见图 6.10)，但在渗透物中的乳糖和盐类利用价值低而常常废弃。这除了造成有用营养物的浪费外，对其处置也需要很高的污水处理费用。于是人们正在强化努力以寻找乳清尤其是渗透物利用的新方法。图 6.10 归纳了一些利用乳清副产物为原料的发酵过程举例。

尽管许多微生物可以利用乳清，但工业上最重要的一些微生物如 *S. cerevisiae*、*Z. mobilis* 和真养产碱菌（*Alcaligenes eutrophus*）却不能利用乳清。乳糖的利用需要有分解代谢酶 β-半乳糖苷酶（由 *lacZ* 基因编码），以便将乳糖二糖水解为其组成糖葡萄糖和半乳糖。此外，与葡萄糖和半乳糖分解代谢途径一起，一个有效的乳糖运转系统也是需要的。这

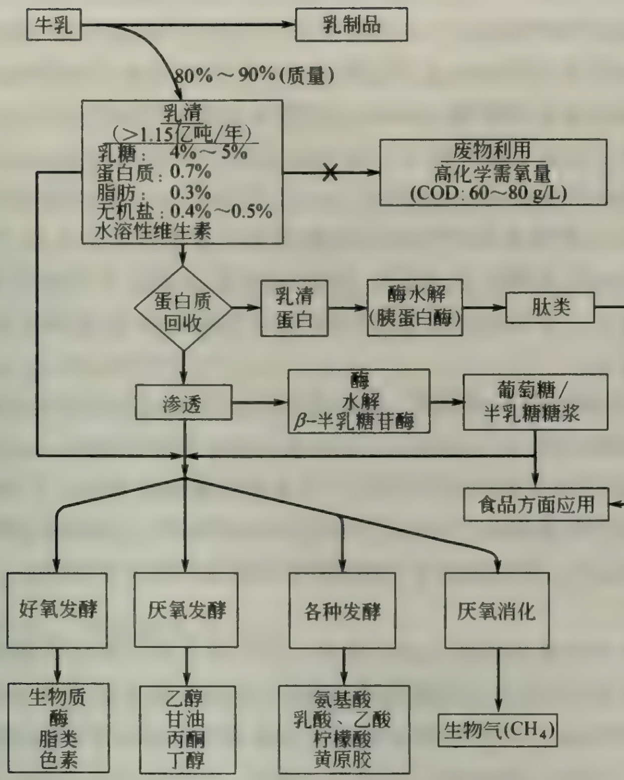


图 6.10　发酵过程中乳清组分的利用（von Stockar and Marison，1990）

些需要在早期的工作中是明显的，这些工作包括：从小肠结肠炎菌（*Yersinia enterocolitica*）将乳糖转座子Tn951（包含有 *lacI*，*lacZ* 和*lacY* 基因：见第5章有关 *lac* 操纵子部分）导入 *Z. mobilis* 中（Carey et al，1983；Goodman et al，1984）。尽管 *E. coli* β-半乳糖苷酶在该菌株中成功表达，但乙醇得率比理论值要低得多，原因至少有两点：第一，乳糖虽由β-半乳糖苷酶切为葡萄糖和半乳糖，但重组菌 *Z. mobilis* 只利用葡萄糖发酵生产乙醇，而半乳糖不断累积到抑制浓度（Yanase et al，1988）。这表明除乳糖操纵子外，还需要半乳糖操纵子。第二，很低的乙醇生产能力是由于乳糖吸收慢造成的。后来的研究利用 Tn951 在嗜糖假单胞菌（*Pseudomonas saccharophila*）和真养产碱菌（*Alcaligenes eutrophus*）中表达 β-半乳糖苷酶（Pries et al，1990）。这使得 *P. saccharophila* 的转结合体（transconjugant）可在乳糖无机培养基上缓慢生长而其原菌株完全不生长。质粒 pPL76，包含着一个 *A. eutrophus* 启动基因-*lacZ* 融合，能使 *A. eutrophus* 不仅表达β-半乳糖苷酶，还能在乳糖培养基上缓慢生长。随后，又将 *E. coli gal* 操纵子转入这些菌株中以允许利用半乳糖。

E. coli lacZY 操纵子（编码 β-半乳糖苷酶和乳糖通透酶）也被整合在 *Pseudomonas aeruginosa* 的染色体上，*P. aeruginosa* 是生物表面活性剂鼠李糖脂的重要生产菌（Koch et al，1988）。转结合体（transconjugant）在乳糖培养基（基础培养基+乳清）中生长良好，并在稳定期生产鼠李糖脂。在噬菌体 ϕLO 启动基因控制下，*E. coli lacZY* 基因也被插入野油菜黄单胞菌（*Xanthomonas campestris*）中，*X. campestris* 是一种给世界范围内农业造成巨大损失的细菌，但它可用来生产黄原胶（Fu and Tseng，1990）。通常，都是利用葡萄糖、蔗糖或淀粉培养基生产黄原胶。然而，该重组菌表达了高水平的 β-半乳糖苷酶并在包

含乳糖为惟一碳源的培养基中生长良好。已经对以乳糖或稀乳清为原料用工程菌生产黄原胶进行了评价，结果发现用这些底物生产黄原胶与用葡萄糖为原料的产量相当。这些实例显示出一些极具吸引力的过程，其在处理工业废物的同时可生产出十分有用的物质。

另一种可供选择的策略是构建一株菌，它能向培养基或周质中分泌 β-半乳糖苷酶，而乳糖在此可自由扩散。应用此法于酵母，通过表达来自黑曲霉（*Aspergillus niger*）的分泌的、热稳定性好的 β-半乳糖苷酶基因（*lacA*）而构建一株利用乳糖的 *S. cerevisiae* 菌（Kumar et al，1992）。研究证实，有 40% 的重组蛋白分泌到培养基中，使 *S. cerevisiae* 能在乳清渗透物（4% *w/v* 乳糖）中生长，倍增时间为 1.6h。与早期的乳清发酵过程相比，该方法具有明显的优点。早期的过程或是利用 β-半乳糖苷酶预水解的乳清，或是将酵母与 β-半乳糖苷酶共固定化。

完整的 *E. coli* 乳糖操纵子曾被插入氨基酸生产菌 *C. glutamicum* R163 中(Brabetz et al，1991)。带有 *lac* 基因的重组 *C. glutamicum* 在强启动基因的控制下，在以乳糖为惟一碳源的特定培养基(3% *w/v*)中迅速生长。生长特征(与在葡萄糖培养基的生长没什么区别)取决于除 *lacZ* 以外 *lacY* 基因(乳糖通透酶)的存在。此外，酶分析表明，所有的 β-半乳糖苷酶活性都是胞内的。不过，该体系的主要缺陷在于细胞不能利用乳糖中另一种单糖——半乳糖。

6.2.4 蔗糖利用

蔗糖（由葡萄糖和果糖组成的双糖）是另一种资源丰富、价格低廉的碳源，其在甘蔗废糖蜜中常见。尽管某些 *E. coli* 菌株能利用蔗糖，但氨基酸工业极有潜力的生产菌 *E. coli* K-12 却不能在蔗糖中生长。许多研究人员试图表达其它菌种的蔗糖利用系统（Scr^+），但却不能在 *E. coli* K-12 中稳定地保持 Scr^+ 表型。最近，一个尝试从下述方法获得成功：将 *E. coli* B-62 中编码蔗糖酶的 *scrA* 基因克隆在一个质粒上，然后将克隆的 DNA 片段转到 *E. coli* K-12 染色体上。表达 *scrA* 基因的 *E. coli* K-12 衍生的色氨酸生产菌株在蔗糖培养基中生长良好，与在葡萄糖上生长的类似菌株相比（Tsunekawa et al，1992），它分泌了大量色氨酸（$5.7g \cdot L^{-1}$）。

6.2.5 降解淀粉的微生物

由玉米、谷物等再生资源获得的淀粉是生物工艺过程中十分重要的碳源和能源物质。淀粉代替葡萄糖不仅能降低发酵原料成本，并且可以减至最小甚至消除葡萄糖引起的负面生理效应，如分解代谢阻遏或产酸。

淀粉是 D-葡萄糖的直链和支链均聚物的混合物，这些均聚物直链由 D-葡萄糖经 α（1→4）糖苷键连接，在分支点由 α（1→6）糖苷键连接。作为植物体中贮糖物质，淀粉大量存在于薯类作物和小麦、玉米、大麦、高粱等作物种子中。线性组分直链淀粉由 α-1,4-D-吡喃型葡萄糖的链组成，聚合度范围是 $10^2 \sim (4 \times 10^5)$。在分支组分支链淀粉中，由（17～23 个单位）α-1,4-D-吡喃型葡萄糖组成的短链通过 α（1→6）糖苷键连在一起形成分支结构，其聚合度范围约为 $10^4 \sim (4 \times 10^7)$。重要的分解淀粉酶有四种类型：α-淀粉酶、β-淀粉酶、支链淀粉酶或异淀粉酶（脱支酶）以及糖化酶。α-淀粉酶是内切葡聚糖酶，可随机切断 α（1→4）糖苷键，将淀粉转化为糊精、麦芽糖和葡萄糖。α-淀粉酶主要产自细菌和真菌，尤其是杆菌属、假单胞属、乳杆菌属及曲霉属菌种。β-淀粉酶通常存在于植物中，它是一种外切葡聚糖酶，可从淀粉分子非还原端开始连续地切下麦芽糖单位。支链淀粉酶和异淀粉酶属于脱支酶族，可水解 α（1→6）糖苷键。糖化酶是一种真菌酶，其从淀粉分子非还原端移走葡萄糖残基。

因为多数微生物不能降解这种葡萄糖生物聚合物，故工作的重点集中于将淀粉水解酶基

因克隆到不同菌体（Kennedy et al，1988）。这种方法提供了一个很有吸引力的替代目前过程的方法。目前的过程是先用酶法把淀粉转化为葡萄糖和一些低聚糖，然后将其作为一个独立发酵步骤的碳源。沿着这条路线，构建了一株含有 *Aspergillus sp*. 糖化酶基因的 *S. cerevisiae* 菌株（Innis et al，1985）。这株重组菌能够在淀粉糊精中生长，尽管与培养基中加有糖化酶的情况相比，其生长速率要慢些。

这种重组菌有益的应用还包括酿造业和烘焙业。酿造上，大麦淀粉在制麦芽过程中部分水解，产生大量不能被 *S. cerevisiae* 菌发酵的糊精。这些糊精含高热量，在生产浅色啤酒时必须将它除去，目前是通过外加糖化酶来完成的。因此，具有淀粉水解特性的工程菌为酿造业提供了一个合适的替代选择，尤其是在生产低热量产品时。另外，这种菌还可消除某些面包生产中对富含 α-淀粉酶的面粉的要求。

具有上述所希望的特性的菌株最近已经构建成功，它是通过在 *S. cerevisiae* 菌中表达酵母 *Schwanniomyces occidentalis* α-淀粉酶（AMY1）和糖化酶（GAM1）基因而进行的 (Hollenberg and Strasser，1990)。比较性的酶催化研究表明，工程化的淀粉水解系统像原来的 *S. occidentalis* 菌一样有效。在液化小麦粉发酵过程中，与通常的在发酵之前先加糖化酶的酒精酵母相比，这种重组菌具有同样的乙醇生产速率。

6.3 扩展产物范围，增加新产品

这对代谢工程来说是一个具有巨大潜力的领域。异源基因的合理表达可扩展宿主生物体中现有的代谢途径，以便大量生产已知的和全新的有吸引力的化学和（或）物理性质的化合物。

6.3.1 抗生素

由微生物生产抗生素是其更有意义的性能之一，尤其是从医学和商业的角度来看更是如此。已从微生物中分离出 10000 多种抗生素和类似的生物活性代谢物。同时，每年还公布约 500 种新的低分子量化合物。从金融财政看，抗生素目前是最重要的一类微生物生物技术产品，全世界年销售额超过 150 亿美元。主要品种包括：头孢菌素、青霉素和四环素，并且这些药剂的大部分是由链霉菌属（和其它放线菌）及不同杆菌生产。尽管相当数量的抗生素在农业上和兽医中应用，但其主要的用途还是人类感染性疾病的治疗。

抗生素是由次级代谢途径产生，次级代谢途径比初级代谢以不太专一的、有时更复杂的方式利用共同代谢物。例如，聚酮化合物抗生素由简单的脂肪酸经一条表面上类似于形成长链脂肪酸的代谢途径生成，但是所产生的化合物呈现出一系列结构复杂性，远远超过基本脂肪酸简单的碳氢化合物骨架。最近，已经变得非常明显，包括抗生素的次级代谢物的得率也可通过基因技术消除生物合成速率控制步骤的方法得以提高。此外，代谢工程技术已被用于修饰已知抗生素以改进它们的性质及合成新的抗生素（Summers et al，1992）。多年来，用丝状真菌和链霉菌属生产抗生素是通过随机诱变/筛选的方法来改进的，在很少的情况下是通过选择高产抗生素的初级代谢前体物突变株来改进的。跨跃四十年的工作开发的生产菌种是不太情愿通过这些传统技术来改进的。

重组 DNA 技术的应用是基于 β-内酰胺生产菌遗传转化系统和生物合成基因克隆的发展。转化重要工业微生物（例如 *P. chrysogenum* 和 *C. acremonium*）的能力为生物合成途径的精确操作提供了一个强有力的工具和实际应用方法，例如对可能限速步骤的基因剂量研究或基因破坏以改变最终产品。研究发现许多抗生素基因是成簇的，而且相关途径的某些基因表现出交叉杂交现象，此发现为该领域开辟了一些新的研究途径（Charter，1990）。基因

成簇便于克隆，并且这些基因通常受正调控的事实增加了通过基因调节分子的过量表达来提高生产的可能性。例如，在野生型菌株中过量表达这些调节基因引起了链霉素、十一烷基灵菌红素和放线菌紫素的超量生产（Charter，1990）。

链霉菌属在具有工业重要性的微生物中排名接近最高，尤其是作为抗生素的生产菌。放线菌紫素生物合成基因是从菌种 *Streptomyces coelicitor*（是遗传背景十分清楚的惟一菌属）转入浅青紫链霉菌（*Streptomyces lividans*）中的，从而能使后者生产放线菌紫素。后来又将 *Streptomyces erythreus* 中的成簇红霉素基因转入 *S. lividans* 中，使重组菌生产红霉素 A。真菌粗糙脉孢菌（*Neurospora crassa*）和黑曲霉（*Aspergillus niger*）与含有产黄青霉菌（*Penicillium chrysogenum*）的青霉素生物合成基因的黏粒的转化，导致由这些菌种生产青霉素Ⅴ。

通过代谢工程提高得率已在一些系统中得到证明。例如，通过在产黄头孢霉属（*Cephalosporium acremonium*）中过量表达 *cefEF* 基因，使头孢菌素产量提高了 15%（Skatrud et al，1989）。该基因编码一个具有顺序表现活性的双功能蛋白：去乙酰氧基头孢菌素 C 合成酶和去乙酰基头孢菌素 C 合成酶（DACS）。重组菌由于 DACS 酶活性增加两倍，因而能将大量分泌的一个前体物青霉素 N 转化为终产物头孢菌素 C。这项工作也识别出头孢菌素 C 合成途径中最后一步反应是潜在的控制步骤，其对应的酶是去乙酰基头孢菌素 C（DAC）乙酰基转移酶，因为在培养基中观察到相当数量的去乙酰头孢菌素（DAC）。

重组 DNA 技术也能用于制造杂交的甚至全新的抗生素。当然，在这样的应用中主要的根本的障碍是生产菌对新抗生素有抵抗力，才能达到高得率。在不同生物体中生物合成步骤的基因可以在同一生物体中组合，因此，就扩展了天然抗生素的多样性。起先，将菌种 *Streptomyces coelicitor* 中合成放线菌紫素途径克隆了的部分转入一株生产麦迪霉素的链霉菌中（Hopwood et al，1985）。该重组菌生产一种杂交抗菌素，被称为麦迪紫素（*mederrhodin*）。天然的麦迪霉素转变为麦迪紫素的过程中包含一个 β-羟基化步骤，且假定该步由具有很宽的底物专一性酶的异源 β-羟基化活性所催化。McAlpine 等已使用一种类似的策略去转化 *Saccharopolyspora erythraea* 的一个突变株，其在红霉素生物合成的一个初期步骤由来自竹桃霉素生产菌抗生链霉菌（*Streptomyces antibioticus*）的 DNA 文库所阻断（McAlpine et al，1987）。其中一支重组菌产生一种具有新结构的抗生素，称为 2-norerythromycin。在产生新抗生素中的一个更大挑战超出单一基团的取代，还包括其主链结构的改变。菌株加利利链霉菌（*Streptomyces galilaeus*）通常生产阿克拉霉素 A 和阿克拉霉素 B，随后用聚酮化合物合酶基因对其转化，获得生产蒽醌的克隆（Bartel et al，1990）。这些激动人心的结果为将来合理设计及合成新抗生素不断进行的努力提供了基础。

6.3.2 聚酮化合物

在许多生物体中发现了聚酮化合物，尤其是在一类丝状细菌——放线菌中量特别多。聚酮化合物家族是具有抗菌性质（如四环素和红霉素）和药理性质（如抗癌制剂和免疫抑制剂）的生物活性分子。这些分子的合成包括称做聚酮物合酶（PKS）的巨型模块酶。聚酮化合物是由简单脂肪酸经一条表面上类似合成长链脂肪酸的途径生成的，但所得化合物展现了一系列复杂的结构，该结构远比生物脂肪酸的简单碳氢骨架复杂得多。与脂肪酸生物合成的一个主要区别在于最初的缩合（β-酮基酸还原、脱水、氢化）不是按常规方式进行，而是依赖于所给聚酮物合酶的模块结构。在脂肪酸合成中，每合成一轮增加一个乙酰基以产生无支链的长链，而在每轮引入的羰基被还原为 CH_2。而在聚酮化合物生物合成中，所添加的单元常大于乙酰基（如丙

二酸单酰辅酶 A)，并且每个缩合步骤于延伸着的链上增加两个碳，而添加单元的剩余部分从主链伸出作为一个分支。一些羰基完全不被还原，另一些仅被还原为 CHOH。

将聚酮化合物作为代谢工程中一个诱人的研究模式的原因包括如下几点：(1) 它们的复杂结构产生于以多种方式组合的简单单元；(2) 酶催化剂（PKS）的模块结构允许酶结构控制，进而聚酮化合物的类型能在基因水平上进行控制。本领域最近的进展已经建立了通过聚酮物合酶的基因工程产生新型聚酮化合物结构的基础，同时也为获得阐明聚酮化合物合酶的结构-功能关系的知识奠定了基础（Kao，1997；McDaniel et al，1993)。此外，该系统提供了在遗传学和化学之间建立桥梁的好机会，而且最重要的是使科学家在 DNA 水平上合理设计新分子成为可能。

由红色糖多孢菌（*Saccharopolyspora erythrea*）生产红霉素

由 *S. erythrea* 生产的这种聚酮化合物产品仅涉及 3 个巨基因，其中每个都编码一个分

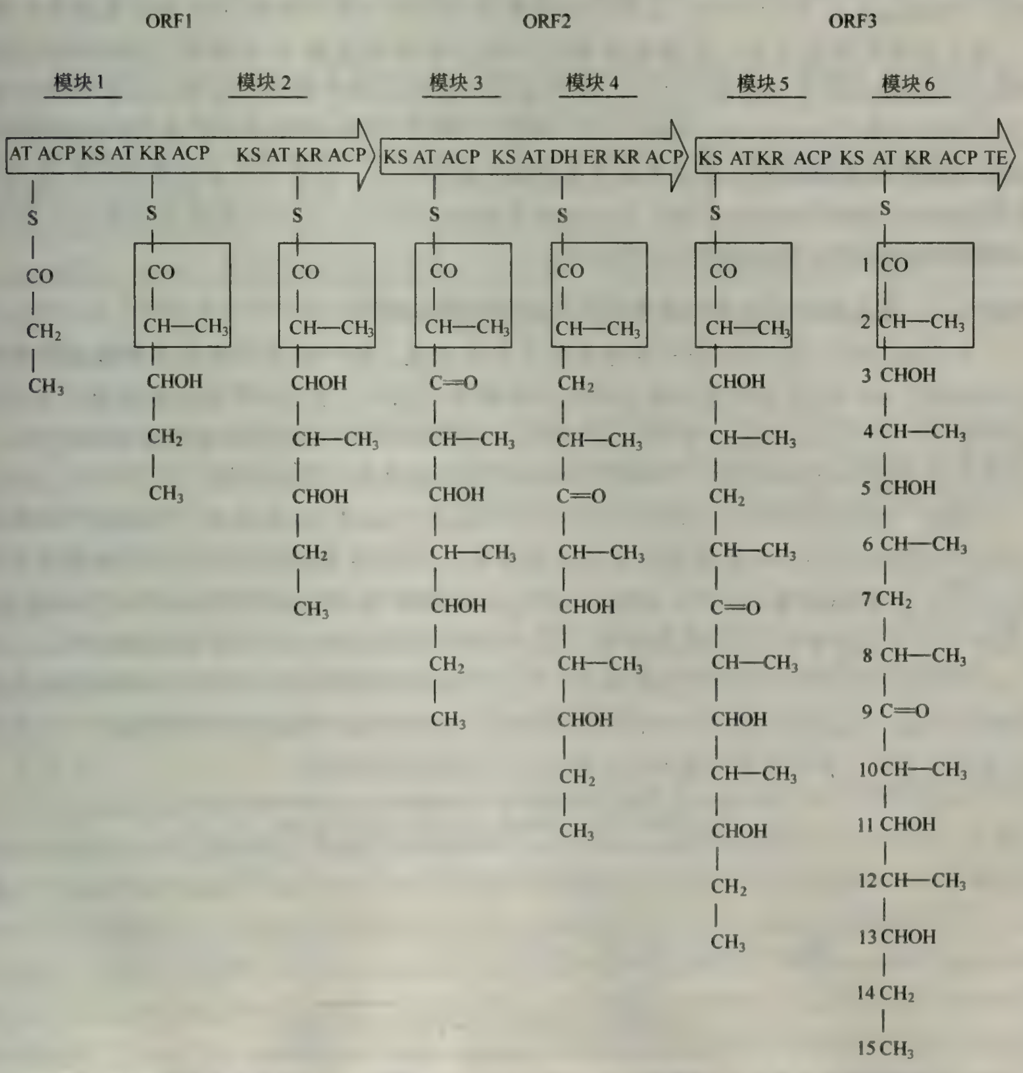


图 6.11　红色糖多孢菌（*Saccharopolyspora erythrea*）中红霉素 A 生物合成基因的组织

DNA 区分为三个开放阅读框架（ORFs)，每个编码一个大的复杂的酶分子。依次每个酶又可分为两个模块，每个连续模块为增长链添加一个新的丙酸基团（方框中)。亚单元：酰基转移酶（AT)、酰基载体蛋白（ACP)、β-酮酯酰基-ACP-合成酶（KS)、β-酮酯酰基-ACP-还原酶（KR)、脱水酶（DH）以及烯酰基还原酶（ER)

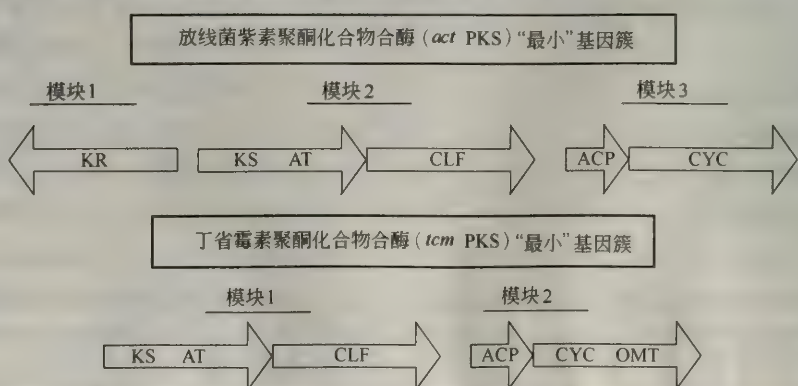
子量大于 300kDa 的蛋白质（Cane et al，1983，1987）。每个蛋白质依次由两次不准确的重复所组成，因此可分为六个模块，如图 6.11 所示。每个模块含有至少六个单功能多肽的组合，每个相应于一个反应步骤：酰基转移酶（AT）、酰基载体蛋白（ACP）、β-酮酯酰基-ACP-合成酶（KS）、β-酮酯酰基-ACP-还原酶（KR）、脱水酶（DH）以及烯酰基还原酶(ER)（见图 6.11）。一个有趣的和/或许是所期待的观察，是这些基因中的一些与脂肪酸生物合成途径的基因高度同源。关于这类组织令人着迷的是新分子可以通过这些基本模块的组合和变换而产生，也可以在功能域内通过点突变来产生。自然界通过这种同样的技术已经产生了聚酮化合物的巨大的多样性。代谢工程在该领域的主要贡献是通过所谓的“遗传设计”来设计目前已知或未知的具有潜在用途的分子的化学结构。

在过去几年中，Khosla 及其同事们集中注意力于解释聚酮化合物合成酶的规律，是通过开发一个链霉菌素宿主-载体系统以表达重组聚酮化合物合酶（PKS）而进行的（Kao，1997；McDaniel et al，1993）。这项工作导致提出一个“最小聚酮化合物形成系统”的概念，该小系统包括缩合酶、酰基载体蛋白和丙二酸单酰辅酶 A 转移酶（McDaniel et al，1994）。其它蛋白质可以起如下作用：或作为决定链延长程度的链长因子，或作为指导链环化方式的环化酶（Hutchinson and Fujii，1995）。最近，用包括最小系统的 PKS 基因的多种组合转化的链霉菌属菌株，已生产了一些聚酮化合物分子，这些为组合生物合成法铺平了道路（Shen and Hutchinson，1996；Tsoi and Khosla，1995）。对这些代谢物的表征已为 PKS 基因编程方面提供了新的理解（方框 6.2）。

方框 6.2　最小聚酮化合物形成系统和 PKS 编程规则举例

S. coelicolor A3（2）是一株遗传背景非常清楚，能产蓝色聚酮化合物放线菌紫素的放线菌。*act* PKS 基因簇已被克隆并全部测序，此外，通过同源重组删除整个 *act* 簇而构建了一支 *S. coelicolor* 菌株（CH999）。再用携带有不同 PKS 基因组合的“最小”基因簇的质粒转化该突变株，以阐明 PKSs 达到其高度专一性的机制。

例如，重组菌 CH999/pRM37 表达一个“最小” *act* PKS 基因簇，同时对丁省霉素（*tcm*）PKS 表达了一个最小基因系列（见下图：AT，酰基转移酶；ACP，酰基载体蛋白；KS，β-酮酯酰基-ACP-合成酶；KR，β-酮酯酰基-ACP-还原酶；CYC，环化酶；OMT，*o*-甲基转移酶）。放线菌紫素（*act*）PKS 在 9 次缩合环化后催化链的终止，而 *tcm*（PKS）在 9 次环化后做这些事情。人们发现这种特殊菌株可以产生两种新的芳香聚酮化合物，其结构已由^{1}H 和^{13}C NMR 确定。通过利用不同的最小基因簇已对类似的实验进行重复，并对所得的聚酮化合物进行了识别和结构分析。



从这些研究得出一些主要结论概括如下（McDaniel et al，1993）。

- 链的长度是（至少部分）由一种特定蛋白所支配，这种特定蛋白被称为“链长决定因子”（chain length determining factor）（CLF）。
- 一些异源酮合酶/想象的酰基转移酶（KS/AT）的 CLF 对产生功能性 PKSs，但其它的对是单一功能的。
- 酰基-载体蛋白（ACP）能在不同合成酶之间相互交换，且不影响产物结构。
- 一种特定的酮还原酶（KR）还原不同长度的聚酮化合物链，这很可能是在完整的聚酮化合物链已经合成之后进行的。
- 不管链的长度如何，这种酮还原酶从羧基末端开始还原 C-9 羰基。
- 第一次环化的区域专一性由 KS/AT 和（或）CLF 控制。
- 催化第二次环化反应的特定环化酶（CYC），显然能在不同长链的中间体及其还原程度之间进行识别。

这些发现，为在这些复杂体系中结构-功能关系的系统研究奠定了基础，并为基于最小聚酮化合物形成系统而合理设计新聚酮化合物分子提供依据。

随着对 PKS 策略进一步解释，可以预期：组合方法所产生的 PKS 系统将允许聚酮化合物库的合成，该库包括数千个新分子。这些库进而可对具有任何性质的分子（从药物到材料）进行筛选。显然，模块 PKS 研究的未来几年很可能是非常令人兴奋的，特别是当人们考虑到这些迷人的酶系统的丰富多样及工程潜力时更是如此。

6.3.3 维生素

维生素 C

已商业化的维生素 C（抗坏血酸）前体物 2-酮基-葡萄糖酸（2-KLG）的生产包含两步发酵过程。首先利用草生欧文氏菌（*Erwinia herbicola*）将葡萄糖转化为 2,5-二酮-D-葡萄糖酸，随后再经棒杆菌属（*Corynebacterium sp.*）菌发酵转化为 2-KLG。为将此两步发酵过程变为一步过程，用编码 2,5-DKG 还原酶（DKGR，其催化 2,5-DKG 转化为 2,5-KLG）的 *Corynebacterium* 菌基因对草生欧文氏菌进行遗传转化（Anderson et al，1985；Grindley et al，1988）（见图 6.12）。在优化培养条件后，这些重组 *Erwinia* 菌在 120h 内生产约 120 $g \cdot L^{-1}$ 2-KLD，基于葡萄糖的摩尔收率约 60%。随后的研究显示了代谢工程菌生产维生素 C 潜在的经济优势，并已申请了一系列美国专利（Anderson et al，1991；Hardy et al，1990）。

生物素

对于许多微生物和动物来说，生物素是一种基本的营养素。它作为多种酶的辅助因子参与脂肪酸和碳水化合物代谢，被用于动物饲料和工业发酵过程的一种添加剂。目前，生物素是通过复杂而昂贵的化学合成法生产的。尽管目前经济上仍有利于化学合成法，但生物素微生物生产过程的进一步改进使生物转化法比现有技术更具竞争性。Barker 等最先在 *E. coli* 菌中描述了由庚二酸辅酶 A（pimelic-CoA）合成生物素的代谢途径（Barker and Campbell，1980），并且识别出球形芽孢杆菌（*B. sphaericus*）中参与庚二酸（pimelic acid）生物素合成的所有酶（Izumi et al，1981）。*B. sphaericus* 分泌大量生物素合成途径中间体的发现导致在此菌中分离到 *bio* 基因。这些基因参与生物素合成，并组织为两个基因簇 *bioXWF* 和 *bioDAYB*，最近这些基因已被克隆在 *E. coli* 载体上（Gloecker et al，1990）。用这些基因转化的 *E. coli* 菌生产了高达 457$mg \cdot L^{-1}$的生物素和 350$mg \cdot L^{-1}$的生物素中间体（sabatié

et al，1991）。

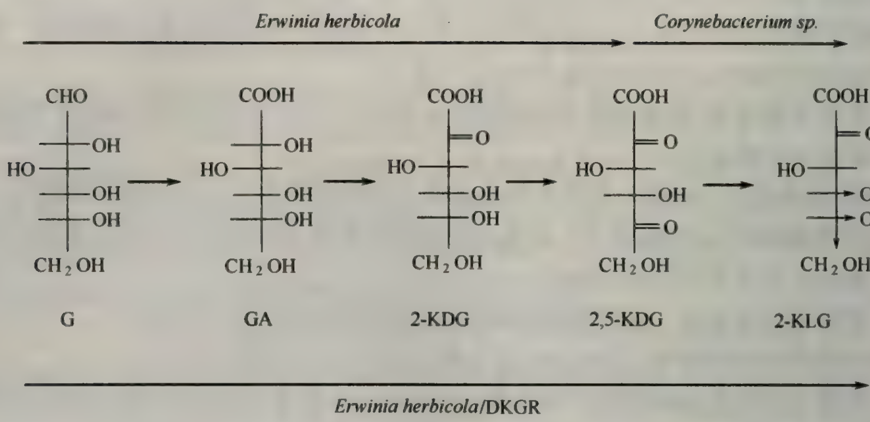


图 6.12 葡萄糖（G）生物转化为2-酮基-L-葡萄糖酸（2-KLG）

包含草生欧文氏菌（*Erwinia herbicola*）和棒杆菌属（*Corynebacterium* sp.）的两步发酵法与基于 *E. herbicola* 表达异源二酮-D-葡萄糖酸还原酶（DKGR）的一步法比较。

中间产物：GA—葡萄糖酸；2-KDG—2-酮基-D-葡萄糖酸；2,5-DKG—2,5-二酮基-D-葡萄糖酸

维生素 A

另一个应用代谢工程，将天然的代谢中间产物转化为所希望的终产物的例子，是维生素 A 的前体 β-胡萝卜素的生产。过去，曾考虑应用藻类和真菌类［例如，粗糙脉孢菌（*Neurospora crassa*），硬壳青霉菌（*Penicillium sclerotiorum*），布莱须霉菌（*Phycomyces blakesleeanus*）］以及红酵母菌属（*Rhodotorula*）生产 β-胡萝卜素，但发现不合适（Ninet and Renaut，1979）。由于类胡萝卜素生物合成的前体香叶基焦磷酸存在于许多生物体中，用于甾醇、何帕醇和萜烯等物质的合成，因此可用适当的基因工程利用上述基础生产 β-胡萝卜素。最近，已克隆并分析了噬夏孢欧文氏菌（*Erwinia uredovora*）中包括 β-胡萝卜素的环状类胡萝卜素的生物合成基因（Misawa et al，1990）。随后用四个 β-胡萝卜素基因对 *Z. mobilis* 菌和根瘤农杆菌（*Agrobacterium tumefaciens*）进行遗传转化，在琼脂平板上获得黄色菌群（Misawa et al，1991）。尽管这两种菌株都不是产生 β-胡萝卜素的天然生产菌，但是转化接合体在液体培养中生产出维生素 A 前体物达 220～350mg（干重）。这些结果还建议生产 β-胡萝卜素的 *Z. mobilis* 菌（*Z. mobilis* 菌被用于乙醇大规模生产）能够接着用作动物饲料，这样由于其中的 β-胡萝卜素而增强了其营养价值。

在相关研究中，又对 *Erwinia* 菌的六个类胡萝卜素基因进行异源表达，结果在 *S. cerevisiae* 菌中获得一系列香叶基焦磷酸盐副产物。取决于线性途径中实际所表达的基因数量，可测得如下一个或多个产物：八氢番茄红素、番茄红素、β-胡萝卜素、玉米黄素及玉米黄素二（葡）糖苷（Ausich et al，1991）。

6.3.4 生物聚合物

由生物体生产聚合物的改进（例如，黄原胶和细菌纤维素）及新的生物聚合物的生产是代谢工程另一个主要应用（Peoples and Sinskey，1990）。世界上约有 93%的化石资源消耗是为了能量的生产，而仅 7%被工业上用来生产包括溶剂和塑料等的有机化学品（Eggersdorfer et al，1992）。因此，用再生资源生产的可生物降解聚合物代替部分合成塑料，似乎对化石燃料的总消耗仅有极为有限的影响。然而，可生物降解塑料的更多使用会给环境污染

和废物处理等相关问题的解决做出突出贡献。同样的本身原有的坚固性和抗降解性曾使塑料成为理想的工业和消费材料，但今天被认为是环境和废物处理问题的根源。与之相比，可生物降解聚合物或部分或完全由可降解材料组成，其或可由非酶水解法降解，或由微生物分泌的酶来降解。虽然一些聚合物（如淀粉、聚乙烯的混合物）只能部分生物降解，但像聚 3-羟基丁酸［P（3HB)］等聚合物是 100%生物可降解的，因为它们能被细菌、真菌和藻类等微生物转化为二氧化碳和能量。目前市场上已出现了多种可生物降解塑料，代表了适合于不同消费品的一系列性质，目前全球市场对这种可生物降解塑料的需求估计高达每年 130 万吨(Lindsay，1992)。

聚羟基烷酸酯

在众多可利用的可生物降解塑料中，聚羟基烷酸酯（PHAs）日益引起人们的重视。PHAs 是一类细胞内用于贮存碳和能源的物质，多数细菌在环境条件受限（例如，氧和氮枯竭及硫酸盐或镁缺乏）时积累 PHAs。环境条件的变化通常引起中间代谢的巨大变换。这些变换大都由总体调节网络控制，该网络有能力对酶所有组成成分的诱导或阻遏进行协调（第 5 章)。最近，这些聚合物因有潜力作为可生物降解热塑性塑料而吸引了相当大的注意力。通过改变发酵过程中的碳源和（或）菌种，就有可能生产各种生物材料，它们的性质可从硬塑料、脆塑料到有弹性的聚合物范围内广泛变化。

1926 年，聚羟基丁酸酯（PHB）作为巨大芽孢杆菌（*Bacillus megaterium*）中的一种组成成分首次被发现。从那以后，已表明 PHB 与相关的 PHAs 存在于 90 多类细菌中。大部分 PHAs 是由长度为 3～14 碳原子的 *R*-(−)-3-羟基烷酸单体组成（见图 6.13)。由细菌合成的 PHAs 可大致分为两组：具有 C3～C5 单体的短链 PHAs［如真养产碱菌（*Alcaligenes eutrophus*)］和具有 C6～C14 单体的中链 PHAs［如食油假单胞菌（*Pseudomonas oleovorans*)］。超过 40 种不同的 PHAs 已被表征，有些聚合物含有不饱和键或其它功能基团(Steinbüchel，1991)。

$$[-O-\underset{\displaystyle R}{CH}-CH_2-\overset{\displaystyle O}{\overset{\|}{C}}-]_x$$

R= 氢	3-羟基丙酸	(3HP)
R= 甲基	3-羟基丁酸	(3HB)
R= 乙基	3-羟基戊酸	(3HV)
R= 丙基	3-羟基己酸	(3HC)
R= 丁基	3-羟基庚酸	(3HH)
R= 戊基	3-羟基辛酸	(3HO)
R= 己基	3-羟基壬酸	(3HN)
R= 庚基	3-羟基癸酸	(3HD)
R= 辛基	3-羟基十一酸	(3HUD)
R= 壬基	3-羟基十二酸	(3HDD)

$$[-O(-CH_2-)_n\overset{\displaystyle O}{\overset{\|}{C}}-]_x$$

$n=3$	4-羟基丁酸	(4HB)
$n=4$	5-羟基戊酸	(5HV)

图 6.13　主要的生物聚羟基烷酸酯的结构

PHB 是分布最广泛且充分表征的 PHA。PHB 生物合成的大部分知识已从细菌真养产碱菌（*Alcaligenes eutrophus*）中获得，该菌由乙酰辅酶 A 通过三种酶的相继作用得到 PHB

(图 6.14)。该途径的第一个酶为 3-酮基硫解酶(或 β-酮基硫解酶),它催化两个乙酰辅酶 A 分子的可逆缩合形成乙酰乙酰辅酶 A,其进而被乙酰乙酰辅酶 A 还原酶(第二种酶)还原为 *R*-(-)-3-羟基丁酰辅酶 A,最后通过 PHA 合酶(第三种酶)将其催化聚合成 PHB。分子研究显示这三种酶的基因被组织在一个操纵子中。PHA 通常是作为一个含有 10^3～10^4 个单体的聚合物而形成的,其在胞内以直径约 0.2～0.5μm 的包含体形式积累起来。当细菌 *A. eutrophus* 生长的培养基中含过量碳源(如葡萄糖)而缺乏某种基本营养物(如氮或磷)时,菌体内积累的 PHB 包含体通常可达细胞干重的 80%。在这些条件下,PHB 合成担当碳的贮备和电子贮槽的作用。当生长条件通过磷或氮的补充而恢复后,PHB 就被催化形成乙酰辅酶 A,而 PHB 又回到先期诱导水平。

对 3-酮基硫解酶和乙酰乙酰辅酶 A 还原酶的诱导研究显示两种酶的活性响应于 PHB-刺激限制都显著提高。这些实验表明 PHB 途径呈现出一种转录控制模式,这类似于由于环境压力所诱导的其它代谢途径的调控方式。这种总体调节网络的例子包括热休克调节子、*pho* 调节子和碳匮乏调节子(见 5.4 节)。最近,真养产碱菌(*A. eutrophus*)的 PHB 生物合成基因(*phaA*、*phaB*、*phaC*)已被克隆,并在 *E. coli*(Peoples and Sinskey,1989; Schubert et al,1988; Slater et al,1988)和多种假单胞菌属(Timm and Steibüchel,1990)中表达。研究发现在真养产碱菌(*A. eutrophus*)的 PHB 途径在所有重组细菌中都发挥功能,当重组菌在碳源过量和氮缺乏的条件下生长时,PHB 的积累在细胞干重中占显著比例。有趣的是,重组 *E. coli* 菌产生的 PHB 量约为 *A. eutrophus* H16 菌水平的 50%,然而 *E. coli* 菌中表达的还原酶水平才比 *A. eutrophus* H16 菌的还原酶水平小 2% 以下。进一步亚克隆识别出 *A. eutrophus* 菌 3-酮基硫解酶的两种不同形式,一个认为是起生物合成的作用,而另一个起分解代谢的作用。某些重组 *E. coli* 菌株中 PHB 所达到高水平(高达细胞干重的 90%)表明或是由于高度的转录多种多样性,或是由于不同菌种间高度的转录同源性。另一个有趣的结果是重组 *P. aeruginosa* 菌株中具有三条不同的途径、用于聚羟基烷酸酯类的合成。当这些细胞在葡萄糖上生长时积累一种聚合物,在此聚合物的组成中 β-羟基丁酸酯、β-羟基癸酸酯和 β-羟基十二烷酸酯是主要成分,而 β-羟基辛酸酯和 β-羟基己酸酯作为次要成分(Timm and Steibüchel,1990)。

共聚物

目前,最具工业价值的 PHA 共聚物是聚 3-羟基丁酸-*co*-3-羟基戊酸[P(3HB-*co*-3HV)],因为其比均聚合物[P(3HB)]具有增强了的柔韧性。在含葡萄糖培养基中添加丙酸或戊酸,会导致产生一个由 3-羟基丁酸酯和 3-羟基戊酸酯组成的随机共聚物(见图 6.14)。该随机共聚物目前由 Monsanto 公司利用杆菌 *A. eutrophus* 发酵葡萄糖和丙酸进行工业生产,商品名为 Biopol。因为 PHA 合成中所含的酶具有很宽的专一性,因此在 PHA 中掺入 C3～C5 单元是可能的。例如,在 *A. eutrophus* 菌中已检测到两种 3-酮基硫解酶,其一起接受来自从 C4 到至少 C10 的 3-酮酰基辅酶 A,而且已经表明乙酰乙酰辅酶 A 还原酶对 C4～C6 的 3-酮酰基辅酶 A 都有活力。通过改变中间代谢,Slater 等已构建一支高产这种共聚物的 *E. coli* 菌株(Slater et al,1992)。其策略是基于丙酸途径 *E. coli* 基因转录调节的遗传消除(组成型表达),因此导致所得菌株能有效利用丙酸并将之掺进共聚物[P(3HB-*co*-3HV)]中。此外,该策略还导入了控制 P(3HB-*co*-3HV)中两种聚合物的比例的能力,这可通过调节培养基中丙酸和(或)葡萄糖浓度来进行。

用真养产碱菌(*A. eutrophus*)生产可生物降解聚合物 PHB 所用的底物包括果糖、葡

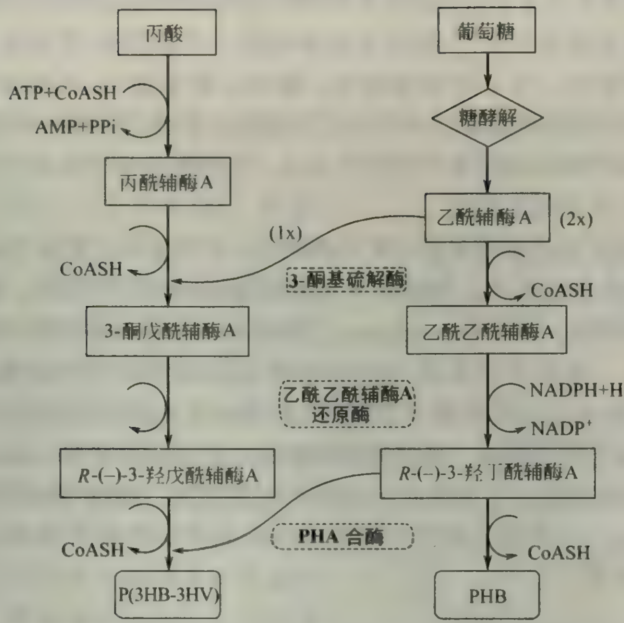


图 6.14 真养产碱菌（*Alcaligenes eutrophus*）PHB 和 P(3HB-3HV）的合成途径

萄糖、乙酸或丁酸以及 H_2 和 CO_2 的混合物。该菌通常不利用乙醇作碳源，但通过表达乙醇脱氢酶基因构建了一支利用乙醇的工程菌，可将乙醇转化为乙醛，而乙醛可进入乙酰辅酶 A 库，其是 PHB 的前体物。更重要的是，同样基因的表达也能利用丙醇，其导致共聚物聚羟基丁酯-戊酯（PHBV）的产生，该共聚物与 PHB 相比，熔点降低并改进了加工性能(Alderete et al，1993)。63g·L^{-1}干细胞中获得 74%（质量比）的 PHB。该共聚物含量随培养基中丙醇分率的增加而增加，相对于纯的丙醇，最大摩尔得率可达 35.2%。

代谢工程在生物聚合物生产中的一个中心问题，是通过硫解酶、还原酶和聚合酶的协调扩增使聚合物生成达到最大化。简单使所有三种酶活性最大并不能解决问题。PHB 合成依赖于乙酰辅酶 A 的供应和 NADPH 的可利用性。前者可通过增加糖酵解的速率进行最大化，然而，糖酵解通量的增加会使戊糖磷酸途径通量减少，进而减少 NADPH 的产生。因此，PHA 产量最大化不是三种酶活性简单扩大的问题，更为关键的问题是优化平衡代谢通量在分支点 G6P 处的分布。顺便说一下，此平衡也可能取决于生长条件，因为当细胞从生长期转移到生产期时对还原力和碳的需求可能发生变换。

需要指出的另一个重要方面是前述三种酶（硫解酶、还原酶、聚合酶）之间相对活性对产品质量有深刻的影响：增加聚合酶活性而保持其它两种酶活性不变获得低分子量的 PHB，这似乎是一个违反直觉的结果，但当考虑实际的聚合机制时就能对此进行解释。最后，该共聚物的生产可通过在发酵过程中补加丙酸来完成，或者通过构建工程菌使其能自己提供丙酸，例如通过苏氨酸降解途径来提供。

植物聚羟基烷酸酯

最近，聚羟基烷酸酯途径已在谷物作物中被表达，这是一个非常有吸引力的系统，它有潜力以低成本大量生产几类化学品。最初，在植物中 PHB 的合成是通过在植物 *Arabidopsis thaliana* 中表达杆菌 *A.eutrophus* 的 PHB 生物合成基因来进行研究的（Poirier et al，1992)。尽管 *A.thaliana* 在农业上并不重要，但选择 *A.thaliana* 作为研究对象是基于如下

原因：在植物中进行遗传和分子研究时它常作为一种模式系统，并且它与油料作物油菜籽密切相关，而油菜是农业规模上生产 PHB 的目标作物。合成 PHB 所需要的三种酶当中，仅 3-酮硫解酶存在于植物中。为了完成该途径，编码乙酰辅酶 A 还原酶和 PHA 聚合酶的 *A. eutrophus* 基因在转基因植物 *A. thaliana* 中进行了表达，发现酶活性定位于细胞质中。这种最初尝试合成的 PHB 仅占菌体干重的 0.14%（比所要求的商业生产水平约低两个数量级），并且对细胞生长有不利的影响。

第二代产 PHB 的转基因植物表明了更大的成功。在植物中，由乙酰辅酶 A 合成脂肪酸发生于质体中，因此质体是通过乙酰辅酶 A 的高的碳通量的一个位点。这个通量在积累油的植物种子中被特别增强，例如 *Arabidopsis*，其种子干重的 40% 是甘油三酯。此外，质体也是积累淀粉的位点，因此质体能够容纳大量的包含体而不破坏细胞器的功能。最近，PHB 途径在质体中的表达已经在转基因植物 *A. thaliana* 中得到证实（Nawrath et al，1994）。质体表达是通过将核酮糖二磷酸酶羧化酶的小亚基的运转肽（transit peptide）与 3-酮基硫解酶和乙酰乙酰辅酶 A 还原酶的 N-端熔合而完成的。PHB 含量在植物寿命期内逐渐增加，最大可达 $10mg \cdot g^{-1}$ 鲜重，即约干重的 14%。这样，PHB 合成从细胞质改向质体导致 PHB 生产提高 100 倍。

果聚糖

果聚糖是一种聚（果糖）分子，其在有限数量的植物中作为贮存物质天然产生，其聚合度较低（5～60 单位）。它能被酶法或化学法水解成果糖，果糖在很多食品产品中正在变为一种普遍流行的甜味剂。由于低聚果糖分子具有甜味，故果聚糖本身可直接作为天然甜味剂使用。由于人体消化系统中不含能分解果糖中 $\beta(2\rightarrow1)$ 或 $\beta(2\rightarrow6)$ 糖苷键的酶类，从而使果聚糖可作为低热量食品成分更具吸引力。除了植物以外，微生物也有能力生产分子量很高的果聚糖（>100000 单位）。例如，在芽孢菌属（*Bacilli*）、假单孢菌属（*Pseudomonas*）和链球菌属（*Streptococci*）中，胞外果糖转移酶将蔗糖转化为细菌果聚糖，通常称为左聚糖。果聚糖生物合成中的主要反应是 nGF(蔗糖)→G-Fn(果糖)+($n-1$)G。为此目的，将 *B. subtilis* 中编码果糖转移酶（通常称为果聚糖蔗糖酶）的 *SacB* 基因进行修饰并导入烟草植株中，获得的转基因植株能够积累果聚糖。产量达干重的 3%～8%，分子量大小和特性等与 *B. subtilis* 合成的果聚糖相似。这种重组果聚糖的一个重要特性是其在植物中的稳定性，这使得该项工作能够在许多食品和非食品产品应用中很有吸引力。

黄原胶

黄原胶是由革兰氏-阴性野油菜黄单胞菌（*Xanthomonas campestris*）生产的一种胞外多糖。黄原胶所具有的高黏度、假塑性等独特的流变学特性，是其在各种食品和工业应用中广泛使用的原因。黄原胶化学结构由一个纤维质的 $\beta(1\rightarrow4)$-葡萄糖骨架与三糖侧链组成，而三糖侧链由两个甘露糖残基和一个葡（萄）糖醛酸残基组成，并与骨架上葡萄糖分子间隔连接。一般情况下，甘露糖在特定位点上被乙酰化和丙酮酰化，但程度不同。参与胞外多糖合成的很多基因通常是成簇的。在野油菜黄单胞菌（*X. campestris*）中已分离到一簇合成黄原胶的基本基因（Barrere et al，1986）。最近的研究已经表明利用重组 DNA 技术能改变黄原胶的结构与性质的潜力。一个含有几个黄原胶生物合成基因的质粒使黄原胶的生产提高了 10%。此外，通过克隆和超量表达酮缩醇丙酮酸转移酶基因，使黄原胶侧链的丙酮酸化程度增加到 45%（Harding et al，1987）。相反地，利用转座子诱变技术可构建菌株，使之合成的黄原胶中丙酮酸含量大大减少（Marzocca et al，1991）。这些研究表明代谢工程在产

物结构控制和黄原胶合成机理的阐明等方面的应用前景。

6.3.5 生物色素

靛蓝

代谢工程应用的一个典型例子，就是利用携带取自恶臭假单胞菌(*Pseudomonas putida*)的萘双加氧酶（NDO）基因的工程菌 *E. coli* 生产靛蓝，NDO 催化靛蓝生物合成的最后一步反应（Ensley, 1985）（见图 6.15）。靛蓝，又叫靛青，作为一种葡糖苷存在于多种植物中，并且自古以来一直被用作蓝色颜料。在过去一个多世纪中，靛蓝是用化学合成法先得到吲哚酚，然后再经氧化得到靛蓝。1927 年，利用选择培养技术分离出一支土壤微生物氧化吲哚假单胞菌（*Pseudomonas indoloxidans*），它能分解吲哚（见图 6.4）形成蓝色结晶，该结晶后来被确定为靛蓝。尽管后来又分离到几种能够由吲哚生产靛蓝的微生物，但没有一种能够实际用于大规模微生物法生产靛蓝，原因主要是：(1)前体物吲哚不易得，(2)靛蓝最后一步生物合成酶 NDO 活性太低。这些早期的靛蓝生产菌株需要联合提供色氨酸或游离的吲哚，其成本限制了它们在工业过程的应用。

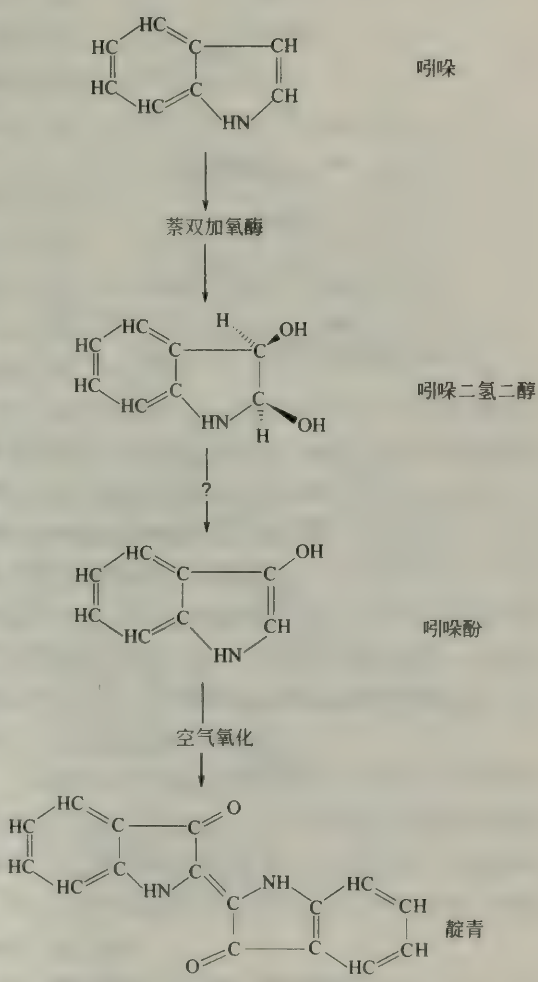


图 6.15 吲哚经萘双加氧酶（NDO）生物合成靛蓝
吲哚（见图 6.4）被 NDO 氧化形成不稳定的吲哚二氢二醇或吲哚酚，吲哚酚再经空气氧化缩合形成靛蓝

早期的尝试集中于过量表达 *Pseudomonas putida* 的 NDO 酶，以提高吲哚转化率。将组成萘双加氧酶系的前四个基因与一个由强启动子 λp_L 控制的多拷贝质粒结合，获得较高的酶活性。为提高 *E. coli* 中异源 NDO 的稳定性，需要进一步的遗传操作。这项工作已导致稳定的 NDO 的高水平表达从而能够用于靛蓝的生物合成。

与此同时，同样的努力研究了直接由葡萄糖进行靛蓝前体物吲哚的合成。正常情况下，吲哚以吲哚-3-甘油磷酸（IGP）或色氨酸一部分的形式存在于细胞中。在重组菌 *E. coli* 中，色氨酸的合成是由色氨酸操纵子的五个基因产物完成的（见图 6.16 和图 6.4）。对于细菌和真菌二者来说，分支酸是芳香氨基酸（包括苯丙氨酸、酪氨酸和色氨酸）生物合成途径的主要分支点化合物。细胞中也存在色氨酸酶，其分解色氨酸并释放出吲哚。然而，早期曾尝试通过过量表达色氨酸酶来刺激吲哚的生产并不太成功，这是由于受色氨酸合成总通量的明显限制。为纠正这一点，扩增了色氨酸合成途径的所有酶。特别是，通过位点专一性诱变使 *trpB* 一部分被修饰，这导致吲哚生物合成增加一个数量级以上（Murdock et al, 1993）。通过结合增强吲哚生产（突变的 *trpB*）和增强吲哚转化为靛蓝（NDO）这两个方

面，最终开发出一支 *E. coli* 菌株，其能用于由葡萄糖从头生物合成靛蓝。

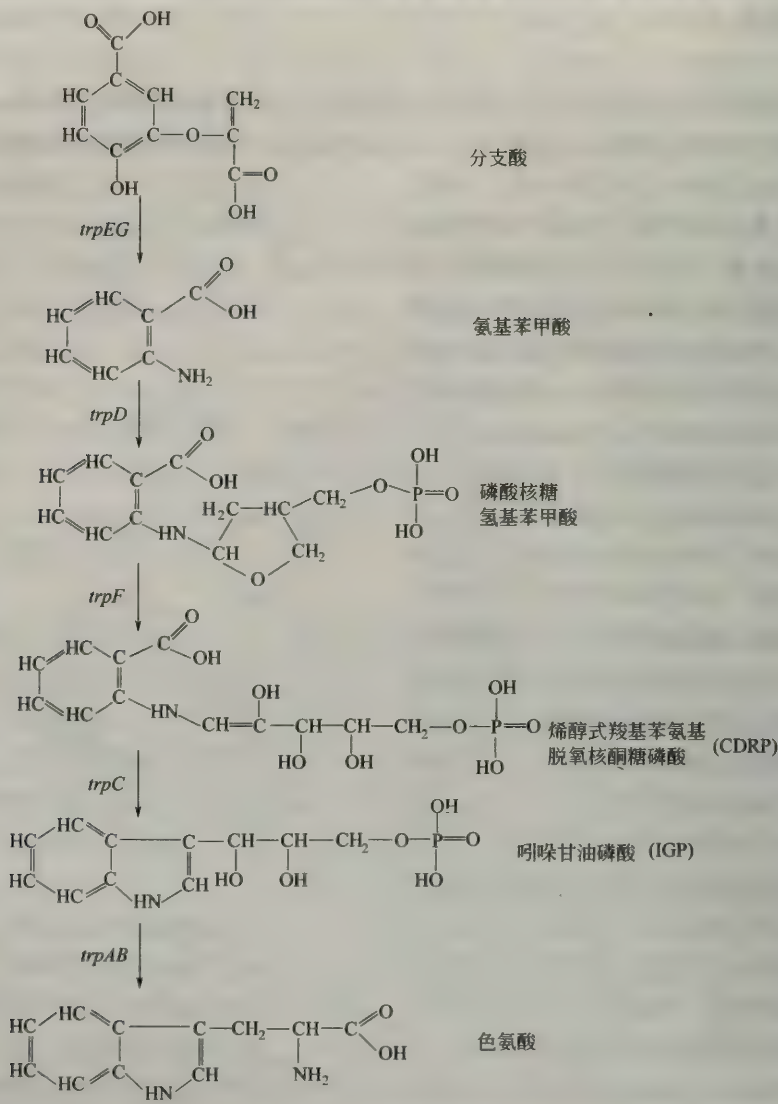


图 6.16　色氨酸生物合成

结构基因名称：*trpAB*—色氨酸合酶；*trpC*—吲哚甘油磷酸合酶；*trpD*—邻氨基苯甲酸磷酸核糖基转移酶；*trpEG*—邻氨基苯甲酸合酶

6.3.6　氢

氢气对用于运输、直接加热或发电造成的污染及不能恢复的化石燃料来说会成为最终代用品。因为氢气燃烧仅放出水蒸气和少量氮氧化物，氢燃料汽车和其它装置不会影响全球变暖（CO_2），而且很少造成空气污染。由制造商（如 Mercedes Benz）生产的原型车辆表明，从性能、舒适度与安全角度看，以氢气为能源的汽车是实用的。氢气并不比甲烷或者汽油危险，事实上，氢气在工业生产中常规使用。美国太空计划已依赖氢气为能源近 40 年，这一事实为氢燃料的广泛使用提供了知识基础。

常规电解技术从水中制取氢气，尽管水是取之不尽的，但是制取过程中所需的能量还是比氢气燃烧放出的能量要稍多一点。已经建议采用其它方式生产氢气，例如利用风能或太阳

能（光电技术）、气化和裂解等。

目前，也在探索利用发酵或酶技术作为潜在的生物路线生产氢气（Kitani and Hall，1989；Taguchi et al，1995）（见图 6.17）。众所周知，筛选的微生物可以将氢气作为代谢终产物而高效生产。代谢工程技术将表明，在把细胞代谢改向高于生理水平的氢气生产方面这将十分有用。至今，已分离出参与氢合成的几个基因，例如取自弗氏柠檬酸杆菌（*Citrobacter freudii*）的氢化酶基因已在 *E. coli* 菌中克隆（Kanamayia et al，1988）。

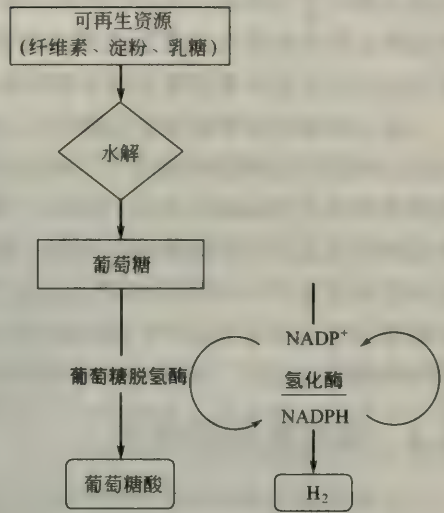


图 6.17　可再生资源转化为氢气

最近，已经研究了体外生产氢气的可能性（Woodward et al，1996）。此系统由两种酶组成，即从嗜酸热原体（*Thermoplasma acidophilum*）中分离到的葡萄糖脱氢酶（GDH）和从激烈火球菌（*Pyrococcus furiosus*）中分离到的氢化酶。GDH 催化葡萄糖的氧化生成葡糖酸-δ-内酯，其用 NADH 或 NADPH 作为辅助因子进一步水解形成葡萄糖酸。尽管细菌氢化酶由于不适当的低势能极少与 NADPH 相互作用，但取自激烈火球菌（*P. furiosus*）和真养产碱菌（*A. eutrophus*）的氢化酶已表明利用 NADPH 作为一个电子供体。Woodward 等（1996）证实 GDH 与氢化酶的组合具有在体外由葡萄糖生产氢气的能力（见图 6.17）。在辅助因子不断循环（至少 20 次）的情况下，由葡萄糖生产的氢气量可达到化学计量得率。这条新发现的途径似乎是从可再生资源生产氢气的一个有吸引力的选择，该过程中也不会直接产生废气（如 CO_2 和 CO 等）。有一个限制需要识别：即需考虑葡萄糖酸的进一步利用，因为即使是小规模氢气生产厂也会产生大量的葡萄糖酸副产物。该过程的将来几代可包括将这些酶以固定化形式用于连续的氢气合成。

绿藻（例如 *Chlamydomonas reihardtii*）可提供一种捕获光能进入燃料氢气的模式（Cinco et al，1993；Lee et al，1995）。近期的研究（Greenbaum et al，1995）表明膜结合光合系统Ⅰ反应中心的突变不会破坏整个光合系统。此原始创新发现否认如下说法：光能转化为化学能时光合体系Ⅰ和光合体系Ⅱ都需要，而且该发现还将光能转化为化学能的最大理论转化率加倍，由 10%提高到 20%。

6.3.7　戊糖：木糖醇

木糖醇是一种可作为理想的防龋齿甜味剂的糖醇；并且消化它时不需要胰岛素而适用于糖尿病病人（Emodi，1978）。自然界中只有某些水果和蔬菜中含有少量的木糖醇，这就使得大量提取困难而且不经济。目前，主要是在碱性条件下用化学方法通过木糖的催化还原制木糖醇，而木糖来自半纤维素的水解产物。后来，研究集中在利用微生物由 D-木糖生产木糖醇。据报道，木糖醇可由酵母生产，尤其是假丝酵母属（*Candida*），如 *C. pelliculosa*（Nishio et al，1989）、*C. boidinii*（Vongsuvanlert and Tani，1989）、*C. guilliermondi*（Meyrial et al，1991）和热带假丝酵母（*C. tropicalis*）（Gong et al，1981）及 *Petromyces albertensis*（Dahiya et al，1991），还可由细菌，如乳红化沙雷氏菌（*Enterobacter liquefaciens*）（Yoshitake et al，1973）、棒杆菌属（*Corynebacterium sp.*）（Yoshitake et al，1971）和耻垢分支杆菌（*Mycobacterium smegmatis*）（Izumori and Tuzaki，1988）。酵母通常含有

代谢木糖的前两种酶：木糖还原酶（XR）和木糖脱氢酶（XDH）（见图 6.7）。通过培养条件优化已将木糖醇生产能力和得率提高到中等水平（$0.32 \sim 2.67 g \cdot L^{-1} \cdot h^{-1}$）（Horitsu et al，1992）。于是，重点放在通过基因修饰来提高木糖转化到木糖醇的生产能力和得率。

在一项初始的研究中，选择 *P. stipitis* XR 来构建生产木糖醇的重组酵母菌（Hallborn et al，1991）。这种选择是基于 XR 的高度专一活性及 NADH、NADPH 都可作为此特定 XR 的辅助因子（Verduyn et al，1985）。由于缺乏 XDH（NADH 再生时需要），在含葡萄糖和木糖的培养基上对重组菌进行研究。葡萄糖耗尽后木糖利用开始并继续进行，最后木糖转化为木糖醇达到 97% 的理论得率，比生产能力为 $0.08 g \cdot g^{-1}$(细胞)$\cdot h^{-1}$。后来的一项研究，其目的在于通过过量表达 *P. stipitis* 中 XR 和 XDH 的基因，扩展含乙醇基因的 *S. cerevisiae* 菌的底物利用范围，很幸运地使木糖醇产量达 $35 g \cdot L^{-1}$（Tantirungkij et al，1993）。

6.4 细胞性能的改进

这类代谢工程目的在于把生物体作为一个整体，因此也称为细胞工程。已经有若干细胞工程成功应用的例子，其中包括从细菌到动物细胞范围很广的生物体。这些应用已把目标定在提高比生长速率和生长得率、提供对有毒化合物的抵抗力、改进特定产物的分泌能力、提高植物细胞的耐旱和耐盐能力以及改变重组多肽的糖基化序列。这是一个挑战与机遇并存的极为重要的领域。

6.4.1 氮代谢的改造

代谢工程早期成功的一个例子是专性甲基营养菌（*Methylophilus methylotrophus*）的氮同化吸收途径的改造，目的是提高单细胞蛋白（SCP）的得率。*M. methylotrophus* 菌曾被选择从甲醇进行 SCP 的工业生产，这是因其具有高的碳转化效率、对甲醇的高耐受性以及营养背景。然而此微生物的氨同化吸收途径有一个主要缺点：它利用谷氨酰胺合酶（GS）和谷氨酸合酶（GOGAT）系统，该系统每将 1mol 氨运输进细胞中需要 1mol ATP（见 2.4.1 节）。相比之下，对应的大肠杆菌氮同化吸收途径利用谷氨酸脱氢酶（GDH），不需要消耗 ATP（见图 6.18）。为了氨的同化吸收，*M. methylotrophus* 菌可能在利用能量亚优途径，因为它是在一个氨浓度较低环境中进行的，而 GS 对氨的亲和力比 GDH 要高。克隆在一个穿梭载体上的大肠杆菌谷氨酸脱氢酶基因（*gdh*），已表明可补充 *M. methylotrophus* 菌的 *gs* 突变株（Windass et al，1980）。结果，工程菌展现了高的甲醇转化为胞内碳的能力，也许是由于经 GDH 的氨吸收途径比偶合的 GS/GOGAT 途径能量更有效。碳的转化效率提高了 4%～7%。

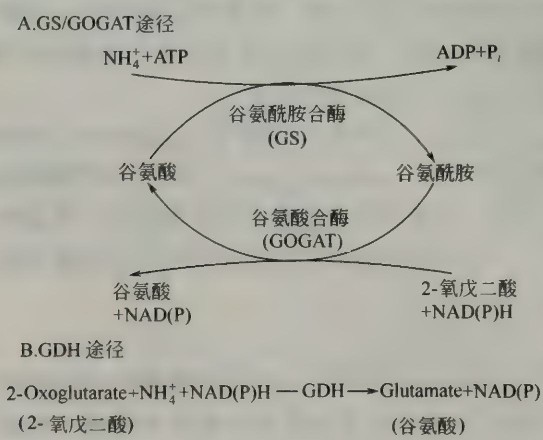


图 6.18 细菌氨同化吸收途径

该工作是代谢工程的第一批工业应用实例之一，它表明为使其在自然生长环境下生存机会最大，生物体所进化的性质在大规模生物反应器的人工环境中并不是必然处于最佳状态。

6.4.2 提高氧的利用

在大规模好氧发酵过程中一个共同的挑战是确保一个适当的氧水平以达到所希望的细胞

生长和生产能力。在微通气条件下（例如非理想混合造成的情况），会发生如下情况：呼吸和发酵代谢各单元均处于活泼状态，并争着完善能量合成和氧化还原平衡。这种氧波动不可避免地导致不希望的生理结果，例如总体的和特定的氧调节响应机制的失效，该响应机制激活或抑制中心碳代谢中的关键酶。这些生存响应由生长速率和产物生成的变动表现出来。

最近研究发现可以用克隆来自透明颤菌（*Vitreoscilla*）（VHb）中的血红蛋白基因（vgb）（Khosla and Baily，1988a，b）来部分减轻这种氧波动和缺氧环境所造成的不希望的结果。尽管它在体内的确切功能尚未确认，但认为 VHb 是一种氧结合蛋白质，从而能使 *Vitreoscilla* 在其自然生境的微氧条件特性中生存。最近的研究表明，VHb 可增加每个还原态氧原子穿越细胞质膜时所逐出的质子数目，并提高大肠杆菌在微氧条件下由 ATP 酶催化的 ATP 合成速率（Chen and Baily，1994；Kalio et al，1994）（见 2.3.3 节）。通量分布分析（第 8 章）也揭示了 VHb^+ 细胞由底物水平磷酸化合成 ATP 速率很小，但在微氧条件下有更大的 ATP 总生产速率（Tsai et al，1995a～c）。此外，从 *cyo/cyd*（通气/微通气末端氧化酶）突变株得出的结果表明大肠杆菌中 VHb 的表达可提高末端氧化酶的水平和活力，从而可以提高微氧呼吸和生长的效率（Tsai et al，1995）。在线培养 NAD（P）H 荧光和氧化还原电位测量（CRP）表明 VHb 缓冲由胞内 DO（溶氧）波动所造成的氧化还原电位紊乱（Tsai et al，1995）。

受这种酶在氧限制条件下有利于菌体生长的学说所激励，*vgb* 基因被转入多种重要工业微生物中。这种蛋白质在范围广泛的宿主中异源表达已经证明：其诱导体内降低氧缺乏效应，促进了细胞生长并增加了产品生成（DeModena et al，1993；Khosla and Bailey，1998a，b；Khosravi et al，1990；Magnolo et al，1991）。例如，携带有该基因单个拷贝并已整合到其染色体的大肠杆菌，在氧限制条件下合成的总细胞蛋白的速率比同基因野生型菌株要快得多。此外，相对于氧限制条件下的 *E.coli* 的对照培养，VHb 的共表达增加了克隆的 β-半乳糖苷酶、氯霉素乙酰转移酶（CAT）和 α-淀粉酶的表达 1.5～3.3 倍。在其它一些例子中，此蛋白的表达在链霉菌（*Streptomyces*）中使一种抗生素的产量提高了 13 倍，在棒状杆菌中使氨基酸的产量提高 1.2 倍。为研究这项技术而成立的 Exogene 公司，已在青霉属和哺乳动物的细胞中成功表达了 VHb。此外，在生物修复领域，用 *vgb* 对嗜麦芽黄单胞菌（*Xanthomonas maltophilia*）的转化导致苯甲酸转化为生物质效率的增加（Liu et al，1996）。

6.4.3 过度代谢的防止

当前，利用大肠杆菌生产重组蛋白质过程中，主要的技术挑战之一是要在高细胞浓度下仍保持高的胞内产物水平。由于抑制性培养副产物的积累，这种双重目标很难达到。不论是在厌氧还是好氧生长过程中，碳通量和还原剂通量是通过酸性副产物的分泌来平衡的，分泌量最多的酸性物质是乙酸，这种弱酸是公认的生长抑制剂。最重要的是它降低重组产物表达的细胞功效，好像是通过干扰二硫键的形成而影响胞内蛋白质的质量。

与无机酸的抑制水平相比，有机酸在低浓度下就可影响细胞的生长。乙酸等在细胞内产生的非解离形式的短链脂肪酸，例如乙酸可自由地透过细胞膜并且在培养基中积累。随后，存在于胞外的一部分非解离的酸又重新进入胞内并解离，产生相对高的胞内 pH 值。这表明，弱酸实际上充当着质子的导体（见 2.2.1 节和例 2.1）。如果这个过程不减缓地继续下去，胞内 pH 值将达到胞外 pH 值水平，将使质子动力的 ΔpH 组分（见 2.33 节和例 13.6）瓦解崩溃（Diaz-Ricci et al，1990；Slonczewski et al，1981）。此外，低的胞外 pH 值（<5）几乎能引起

完全生长停滞（没有细胞溶菌发生），这或许是因为DNA和蛋白质的不可逆变性。

除了上述细胞能学的影响之外，还有很多其它因素在弱有机酸的抑制性质中起作用，这就使得使乙酸分泌最小成为优化重组过程生产得率的一个先决条件（Yee and Blanch，1992；Zabriskie and Arcuri，1986）。Jensen 和 Carlsen（1990）等人研究了乙酸对于 *E. coli* 中人生长激素生产的影响，恒化器数据清楚表明乙酸在此重组系统中的重要作用。通过改变进料中乙酸的量已经确定：$40mmol \cdot L^{-1}$的乙酸水平使重组蛋白得率降低约35%，但对生物量得率无任何影响。这个结果与一般观察相符合，即影响重组蛋白得率的乙酸低限浓度低于造成显著生长抑制的浓度。在同一研究中，乙酸浓度提高到$100mmol \cdot L^{-1}$时使生物质得率减少70%以上，而重组产品得率下降了2倍。其它一些研究者也涉及把乙酸作为重组过程生产能力降低的一个重要因素（Brandes et al，1993；Brown et al，1985；Curless et al，1988；Luli and Strohl，1990；Starrenburg and Hugenholtz，1991）。

如下事实已被广泛接受：乙酸的分泌是由于糖酵解通量和细胞对代谢前体物及能量的实际需要量之间不平衡造成的。丙酮酸是糖酵解作用的最终产物，同时也是乙酸的前体物质。因此丙酮酸为实现乙酸的积累提供了一个恰当的接合点。该策略包括引入一个异源酶，以催化过剩的碳通量改向到比乙酸不太有害的副产物方向。枯草芽孢杆菌（*B. subtilis*）乙酰乳酸合成酶（ALS）曾被选中用于此目的，这是基于这组微生物的发酵特性（Johansen et al，1975）。表6.6是 *E. coli* 等进行混合酸发酵菌的副产物量与 *Bacillus subtilis* 和多黏气芽孢杆菌（*Aerobacillus polymyxa*）等丁二醇生产菌的副产物量的比较。很明显：第二组成员与大肠杆菌相比仅生成非常少量的酸，因为它们把葡萄糖主要转化为中性物质2,3-丁二醇。

表6.6　混合酸发酵与丁二醇发酵的比较[①]

产　物[②]	混　合　酸		丁　二　醇	
	E. coli	*P. formicans*	*B. subtilis*	*A. polymyxa*
2,3-丁二醇	0.26	—	54.60	65.1
3-羟基丁酮	0.19	—	1.56	2.8
甘油	0.32	—	56.80	—
乙醇	50.5	64.0	7.65	66.2
甲酸	86.0	105.0	1.32	—
乙酸	38.7	62.0	0.16	2.9
乳酸	70.0	43.0	17.61	—
琥珀酸	14.8	22.0	1.08	—
二氧化碳	1.75	—	117.8	199.6
氢气	0.26	—	0.16	70.9
碳回收率/%	94.7	96.0	98.0	101.6
氧化/还原平衡	0.91	1.02	0.99	0.99

① 取自 Wood，1961。

② $mmol \cdot 100mmol^{-1}$发酵的葡萄糖。

图6-19表明，丁二醇生产菌通常有两种不同的酶将丙酮酸转化为乙酰乳酸：即“pH 6”乙酰乳酸合成酶（ALS）和乙酰羟酸合成酶（AHAS）。AHAS，在许多微生物中都已发现的一种合成代谢酶，它也催化由丙酮酸出发合成缬氨酸、亮氨酸和异亮氨酸等支链氨基酸的那些初始步骤。AHAS也是一种黄素蛋白，它受终产物（如缬氨酸）的反馈抑制调控。另一方面，ALS既不需FAD来辅助活化，也不被支链氨基酸所抑制（Stormer，1968）。

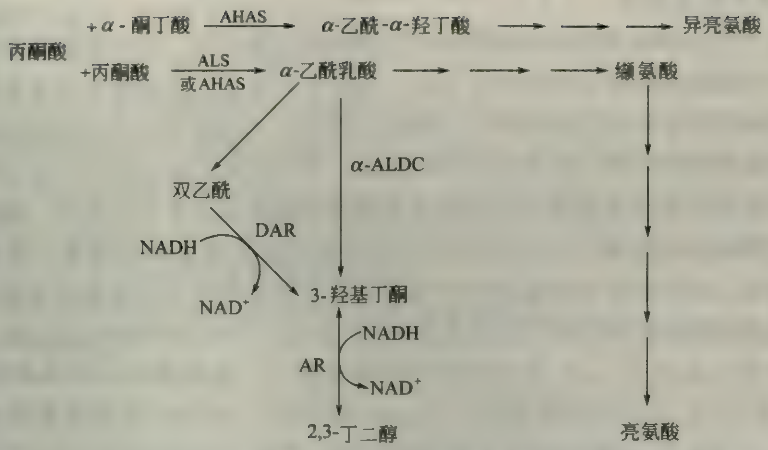


图 6.19　ALS 与 AHAS 酶的比较以及它们在支链氨基酸合成与丁二醇形成中的作用

缩写：ALS—乙酰乳酸合酶；AHAS—乙酰羟酸合成酶；α-ALDC—α-乙酰乳酸脱羧酶；AR—3-羟基丁酮还原酶（或 2，3-丁二醇脱氢酶）；DAR—双乙酰还原酶

B. subtilis 中编码乙酰乳酸合酶的 *alsS* 基因在 *E. coli* 中被成功表达（Aristidou et al, 1994a, b)。这个酶作用于丙酮酸分支点，使过量的碳通量离开乙酸分支途径改向生成非抑制性副产物 α-乙酰乳酸。所得工程菌株的表征说明即使在富葡萄糖培养基中高密度培养，乙酸分泌量仍可维持在 20mmol·L^{-1}以下。此外，这种工程菌是重组蛋白生产更有效的宿主（Aristidou et al, 1994)：重组 β-半乳糖苷酶体积表达在分批培养中可提高约 50%，而在高细胞浓度流加培养中可以提高约 220%。这些结果都证实了代谢工程在细胞特性改进方面的成功应用。

6.4.4　底物吸收的改变

营养物质通过跨膜运输而被吸收是所有生物机体的一项重要任务。除自由扩散以外，运输过程通常可分为三类：(i）促进扩散；(ii）基团转位；(iii）主动运输（见 2.2 节）。葡萄糖、甘露糖和果糖等己糖进入细胞主要是通过依赖磷酸烯醇丙酮酸的碳水化合物，磷酸转移酶系统（PTS)，这是一个基因转位过程（Dills et al, 1980；Postma et al, 1993；Saier et al, 1988)。不管糖或微生物，由 PTS 催化的总过程可以总结如下

$$-(\text{PEP})_{\text{IN}}-\underset{(糖)}{(\text{carbohydrate})_{\text{OUT}}}+\underset{(丙酮酸)}{(\text{pyruvate})_{\text{IN}}}+\underset{(糖\text{-}P_i)}{(\text{carbohydrate-P}_i)_{\text{IN}}}=0$$

PTS 在含有细胞质以及膜结合蛋白的一系列步骤中，完成糖的转位和磷酸化（见 2.2.3 节)。

PEP 除了在糖吸收上起重要作用外，也是几个专用化学品的基本前体，包括芳香族氨基酸、靛蓝、肠杆菌素和黑色素等。因此，通过提供一种非-PTS 糖吸收替换系统，那么，从原理上每消耗 1mol 葡萄糖就可节约 1mol PEP。为了改进 PEP 用于生物合成目的的可利用性所使用的一些方法包括：非-PTS 碳源的使用、通过 PEP 合酶超量生产使丙酮酸循环到 PEP（Patnaik and Liao，1994；Patnaik et al，1995）以及丙酮酸激酶的灭活（Mori et al, 1987)。该领域的一个重要突破产生于一株 *E. coli* 菌株中葡萄糖 PTS 基因 *ptsH*、*ptsI* 和 *crr* 的缺失，以致葡萄糖不再经 PEP-消耗系统被运输进细胞（Flores et al, 1996)。后来，在恒化器培养中“回复体”(Revertant）菌株被选择，其后来被表征具有一个能够有效运输葡萄糖的半乳糖通透酶基因。这株稳定的、快速生长的工程菌 NF9 后来被用于被提高的 DAHP 合酶（此酶缩合 PEP 和 4-磷酸-赤藓糖形成 DAHP）的遗传本底，证明了葡萄糖运输中所节约的 PEP 被改变方向进入芳香族氨基酸途径中。

6.4.5 遗传稳定性的维持

近几年间，已普遍应用质粒克隆载体作为基因的运输工具，这些基因的产品具有科学或商业兴趣。一个质粒载体所希望的特征包括：相对分子量小、依应用情况可具有高或可控制的拷贝数、为高水平基因表达的强而可控制的启动子，而更重要的是其结构和遗传稳定性。遗传不稳定性是重组微生物工业利用的主要障碍。导致这种不稳定性的原因可能有多种，而且一般说来，那些在指导蛋白质生产中最有效的表达载体通常更加不稳定。这可能是施加于细胞的代谢负荷增加的结果，而且在几代之内可能导致出现无质粒群体。除分离不稳定性外，由于同源重组事件的结构不稳定性可导致不再产生所需产品的质粒衍生物。

分离不稳定性和结构不稳定性的防止是过去 15～20 年中集中研究的主题。结构不稳定性一般可通过宿主细胞上 *recA* 基因的缺失而降至最小。这种缺失应严格限制在染色体外 DNA 和染色体 DNA 之间的同源重组。Csonka 和 Clark（1979）在其早期的研究工作中已表明 Δ(*srl-recA*)306 突变使重组率降低 36000 倍。此外，Laban 和 Cohen（1981）已表明 *recA* 基因点突变使一个质粒内的重组事件的频率降低 100 倍。另一方面，分离不稳定性是一个更具挑战性的问题，其需要更复杂更精细的解决办法。

已经设计提出一些获得遗传上稳定的质粒的策略方案，最简单基本的解决方法似乎是在生长培养基中添加抗生素，从而选择包含具有抗菌素抗性的质粒载体的细胞。该方法有一些明显的缺点，例如需使用价格昂贵且形成污染的抗生素。后来，Skogman 和 Diderichsen 提出一种讲究实用的方法（Diderichsen，1986；Skogman et al，1983）。他们使用了一种特定的宿主-载体系统，在此系统中，导致一株营养缺陷型宿主的一个特定染色体突变是由目的质粒载体上一个相应的功能基因所补充。虽然这是一个强有力的方法，但其应用性受到限制，原因是需要具有特定突变的特定宿主菌。

具有更广适用性的一项技术包括质粒 R1 的 *hok*/*sok* 基因座（以前的 *parB*）。该系统是通过其协调能力而发现的，该能力是协调促进革兰氏阴性菌中多种质粒的稳定化（Gerdes，1988；Gerdes et al，1986）。后来，证实更多的质粒保持是由于细胞的有选择性杀死的结果，这些细胞指其在分开点失去含 *hok*/*sok* 的质粒。*hok*/*sok* 基因座编码两种 RNA，即 *hok*（杀死宿主）mRNA 和 *sok*（抑制杀死）RNA。*hok* 产物是很强的细胞致死剂，它从内部通过破坏细胞膜来杀死细菌。*sok* 产物是一个反式反义 RNA（*sok* RNA，见方框 6.3），它在转录后水平抑制 *hok* 基因的表达。迅速而选择性杀死无质粒分离体可用以下理论来解释：*hok* mRNA 是极端稳定的（$t_{1/2}$约 20min），而 *sok* mRNA 迅速衰亡。因此，在含有质粒的细胞中，*sok* RNA 阻止了 *hok* 蛋白质的合成而细胞仍能存活。另一方面，当无质粒的分离体出现时，不稳定的 *sok* RNA 分子衰亡，因此致使稳定的 *hok* RNA 容易得到转录。结果，*hok* 蛋白被合成，因而导致无质粒分离体的死亡。

6.5 异生物的降解

天然过程（包括生物过程和地球化学过程）都产生大量的各种各样的有机化合物，而且经过无数代的进化，不同的微生物已经渐渐形成几乎可以降解所有这些天然化合物的能力，进而将其作为碳和（或）能量的一种来源。然而，为了工业或农业目的由人类生产的数万种人工合成的有机化合物在微生物世界还没有明显的对手。这些合成的新的化合物被称做异生物，这一称谓来源于希腊语 *xenos*，意思是指“外来的”。异生物（如后面讨论的 PBC 等）是稳定的而且是脂溶性的，因此在其穿越经过食物链时被不断地富集浓缩。

异生物的降解是一个迅速发展的领域，给代谢过程带来巨大的机遇。它主要包括利用基因工程菌降解污染物，这通常被称为生物修复。生物修复目前正被用于降解废有机化合物，它们来自土壤，地下水，化工厂和食品加工厂的废水，以及石油炼制厂排出的含油污泥等。

早期异生物降解微生物的分离工作集中于恒化器培养选择法。这项技术是基于用取自不同的有毒废物垃圾点的微生物样品接种于恒化器培养，进而选择所希望的菌种。通过这种方法，已经分离到一株假单胞菌（*Pseudomonas*），它能够降解卤化物（如除草剂 2,4,5-三氯苯氧基乙酸等）(Kilbane et al，1983)。这种菌在一周内成功地除去了土壤中 98%的污染物，然后迅速死亡，因为它不能与内源菌种相抗衡。

除了恒化器选择法外，设计有用的分解代谢途径的理性方法在过去 10 年已经有一些相关报道，下面将讨论之。

方框 6.3　反义 RNA

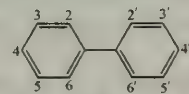
天然的反义 RNAs 是小的（15～50 个核苷酸)、不被翻译的、具有调节作用的 RNA 分子，它抑制了它们的目标 RNAs 的功能，这些目标 RNAs 与之是互补的。反义 RNAs 调节如此多种多样的功能，如质粒复制、连接、维持、转座及细菌噬菌体溶菌-溶源性的断定等。反义 RNAs 通过该反义 RNA 中的一个单链环与目标 RNA 中的一个补充环之间的一个初始可逆接触联系来识别其目标 RNA。该初始可逆接触联系之后是这两个 RNA 分子之间一个热力学上非常稳定的复式结构的形成。

反义 RNAs 可能通过几个不同的机制来抑制其目标 RNA 的功能。例如 Tn10 的可转座基因受 RNA-OUT 调节，而 RNA-OUT 是对可转座 mRNA 的翻译起始区（TRI）的反义补充。在这种情况下，已经表明反义 RNA 对 mRNA 的杂交物理上阻塞了在该可转座基因上核糖体的进入，这是由一个反义 RNA 促成的直接目标 RNA 抑制的例子。

由反义 RNAs 引起的间接目标 RNA 的抑制已经在几个例子中描述了。经典的例子可能是质粒 ColE1 的复制控制回路。反义 RNA（RNA Ⅰ）与复制起始的引物 RNA Ⅱ 相互作用，从而诱导了杂交位点下游几百个核苷酸分子二级结构的改变。这种二级结构的变化阻止了依赖核糖核酸酶（RNase）H 的引物 RNA 的切割，而这种切割是复制起始的前提。

6.5.1　多氯联苯（PCBs）

PCBs 是一类含有一个联苯，并且其上带有 1～10 个氯的人工合成化合物，共 209 种（见图 6.20)。从 1929～1978 年，大约生产了 70 万吨的 PCBs，其中大部分（几十万吨）被释放到环境中。虽然有一些天然的微生物能够氧化一氯、二氯及三氯 PCBs，但并没有能够氧化更高氯化了的 PCBs 的微生物。在自然界中降解 PCB 的最普通的方法可能是协同代谢，但是，这是一个非常缓慢的过程，由于最初的转变不能为微生物的生长提供碳源或能源。



联苯

图 6.20　多氯联苯(PCB)的一般结构式

数字表示可能的氯化位点。经验式为：$C_{12}H_{12-n}Cl_n$，式中，$n=1\sim10$

PCB 降解酶基因（*bph A*，*bph B*，*bph C* 和 *bph D*）已从假单胞菌 *Pseudomonas* LB400 中分离得到（见图 6.21)，并进而在一株 *E. coli* 菌中已过量表达。以 PCB 降解的特效性和程度来表示，重组菌的降解能力可以与 LB400 菌相比。

通过在假单胞菌 *Pseudomonas* 中引入特定基因，有可能构建出菌株降解芳香化合物的混合物，例如工业废物中常见的 3-氯(或 4-甲基)苯等（Rojo et al，1987)。另一种十分有意义的降解

芳香化合物的酶系是白腐菌 *Phanerochaete chrysosporium* 的木质素酶，它能够分解范围很广的异生物，甚至包括各种结构，如苯并芘与苯甲烷染料等（Bumpus and Brock，1988）。

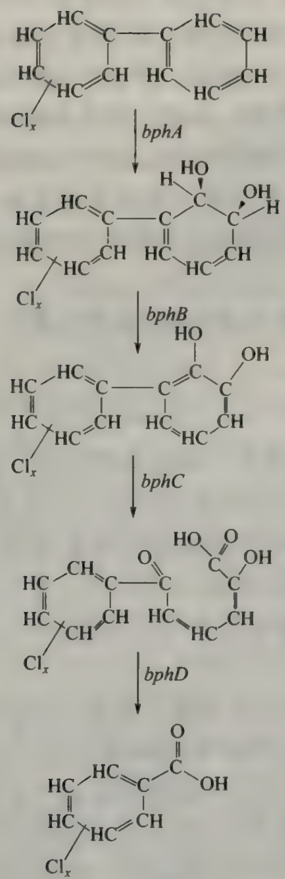


图 6.21　氯化联苯由假单胞菌 *Pseudomonas* LB400 中 2,3-双加氧酶途径的降解
基因名称：*bphA*—联苯 2,3-双加氧酶；*bphB*—二醇脱氢酶；*bphC*—2,3-二氢二苯双加氧酶；*bphD*—2-氢-6-氧-2,4-二烯酸水化酶

6.5.2　苯、甲苯和对二甲苯混合物（BTX）

这组来自石油的污染物是水溶性的，因此能污染水资源，给人类的健康造成严重的威胁。一些研究已集中在构建基因工程菌，它能够将这类污染物单个地或共同地转化为没什么毒害的物质，如丙酮酸。下面讨论两个这方面的例子。

TOL（pWW0）分解代谢质粒

分解代谢质粒通常包含某些降解途径所需要的一套完整基因，特别是在假单胞菌 *Pseudomonas*，其无处不在。它们是可自传递的，并且许多都具有广泛的宿主范围，这使得它们在自然界中特别有用，在自然界这样一些分解代谢途径能被不同物种利用。至今很多分离得到的分解代谢质粒具有降解芳香族化合物的代谢途径，这也许是因为，在自然界中除葡萄糖外，苯环是第二种含量丰富而可作为结构单元的物质。

来自恶臭假单胞菌（*Pseudomonas putida*）的 TOL（pWW0）分解代谢质粒，已表明赋予其宿主降解甲苯、间或对-二甲苯以及其它苯衍生物的能力。这些基因组成两个操纵子（见表 6.7 和图 6.22）：（1）*xylCAB*，其编码可将甲苯和二甲苯分别降解为苯甲酸和甲苯（甲）酸（上部途径），（2）*xylXYZLEGFJKIH*，其编码可将苯甲酸和甲苯（甲）酸分别降解为乙醛和丙酮酸（下部途径）。在 2-羟基己二烯二酸半醛（2-hydroxymuconic semialdehyde）处的分支点，拓宽了由此途径可降解底物的范围。例如，甲苯（甲）酸经 *xylF* 分支途径降解，而苯和对二甲苯经 *xylGHI* 分支途径降解。

为了拓宽一种生物可利用的底物范围，基因工程技术已被应用。例如，带有 TOL 质粒的 *P. putida* 菌可以在各种烷基苯上生长，如苯甲酸（盐）、3-甲基苯甲酸（盐）和 4-甲基苯甲酸（盐）（3MB和4MB）、3，4-二甲基苯甲酸（盐）（3，4DMB）以及3-乙基苯甲酸

表 6.7　TOL 分解代谢质粒 pWW0 的基因和相应的产物

基　因	酶或功能	基　因	酶或功能
上部途径操纵子		*xylH*	4-草酰丁烯酸互变异构酶
xylA	二甲苯加氧酶	*xylI*	4-草酰丁烯酸脱羧酶
xylB	苯乙醇脱氢酶	*xylJ*	2-氧-4-戊烯酸(2-Oxopent-4-enoate)水合酶
xylC	苯甲酸脱氢酶	*xylK*	2-氧-4-羟基戊烯酸(2-Oxo-4-hydroxypentenoate)
下部途径操纵子		*xylL*	二羟基环己二烯羧化酶脱氢酶
xylX,*xylY*,*xylZ*	甲苯双加氧酶	调节	
xylE	邻苯二酚 2,3-双加氧酶	*xylR*	转录调节
xylF	2-羟基黏康酸半醛水解酶	*xylS*	转录调节
xylG	2-羟基黏康酸半醛脱氢酶		

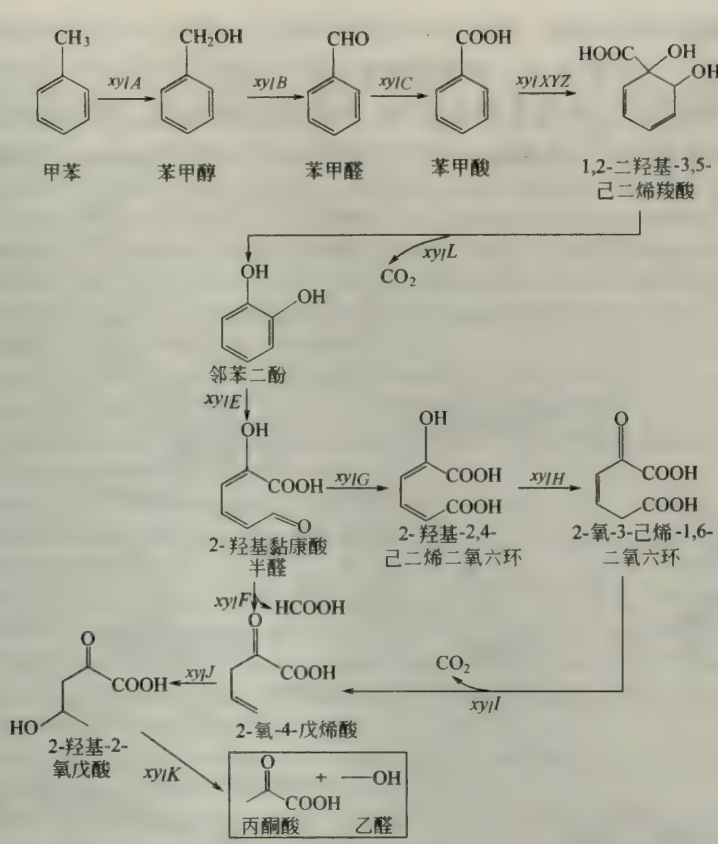


图 6.22　由 *Pseudomonas putida* 重组菌 mt-2 降解甲苯

(盐)(3EB) 等，但不能在密切相关的化合物 4-乙基苯甲酸（盐）(4EB) 上生长。解释这种现象的一系列实验已得出结论：(1) 4EB 没有激活关键的调节蛋白（*xylS*），从而不能诱导苯甲酸盐分解代谢途径的基因（*xylABC*，见图 6.22）；(2) 原来的邻苯二酚 2,3-双加氧酶（*xylE*，见图 6.22）不能利用 4-乙基邻苯二酚作为底物（但可以利用 4-甲基邻苯二酚）(Ramos and Timmis，1987)。这样，要想通过此途径降解 4EB 就需要：(1) 具有更广效应物专一性的 *xylS* 调节器；(2) 能降解 4-乙基邻苯二酚的邻苯二酚 2,3-双加氧酶突变酶的产生。这些策略都已执行，导致突变了的 *xylS* 和 *xylE* 基因的分离，其产品表现出与上述需要一致（*xylS*' 和 *xylE*'）。带有一个 TOL 质粒（质粒上含有 *xylS*' 和 *xylE*' 基因）的 *P. putida* 菌确实能够在上述提到的各种通常底物以及 4EB 上生长。

BTX 混合物同时生物降解

由于 BTX 物质通常是作为三种芳香族化合物的混合物被释放到自然环境中的，因此菌种选育的目的都是为了获得能够同时降解这三种芳香族化合物的菌株（Lee et al，1994）。为此，已经获得一株 *P. putida* 菌，它包含两条分解代谢途径：一条是前面讨论过的 TOL 途径，另一条是 TOD 途径。TOD 途径的酶系可以作用于全部三种芳香族化合物，然而此途径终产物（苯、甲苯、对二甲苯-顺式-乙二醇）不能被进一步代谢。另一方面，TOL 途径的酶只能作用于甲苯和二甲苯，但其终产物可以用做能源和碳源的中间体。图 6.23 总结了这种组合分解代谢途径的一般形式。

通过包括 TOL 和 TOD 所有酶曾构建一株原始菌株。然而表征研究显示：这种菌株积累

大量的TOD代谢终产物，即苯、甲苯、对二甲苯-顺-乙二醇等。为了减弱这种现象，TOD途径的最后一步的酶——甲苯-顺-乙二醇脱氢酶被阻断（如图6.23所示）。最后所得的菌种能够以显著的速率降解所有三种芳香族化合物，其降解速率对苯、甲苯和对-二甲苯分别为：0.27mg·mg^{-1}(生物质)·h^{-1}，0.86mg·mg^{-1}(生物质)·h^{-1}，2.89 mg·mg^{-1}(生物质)·h^{-1}。

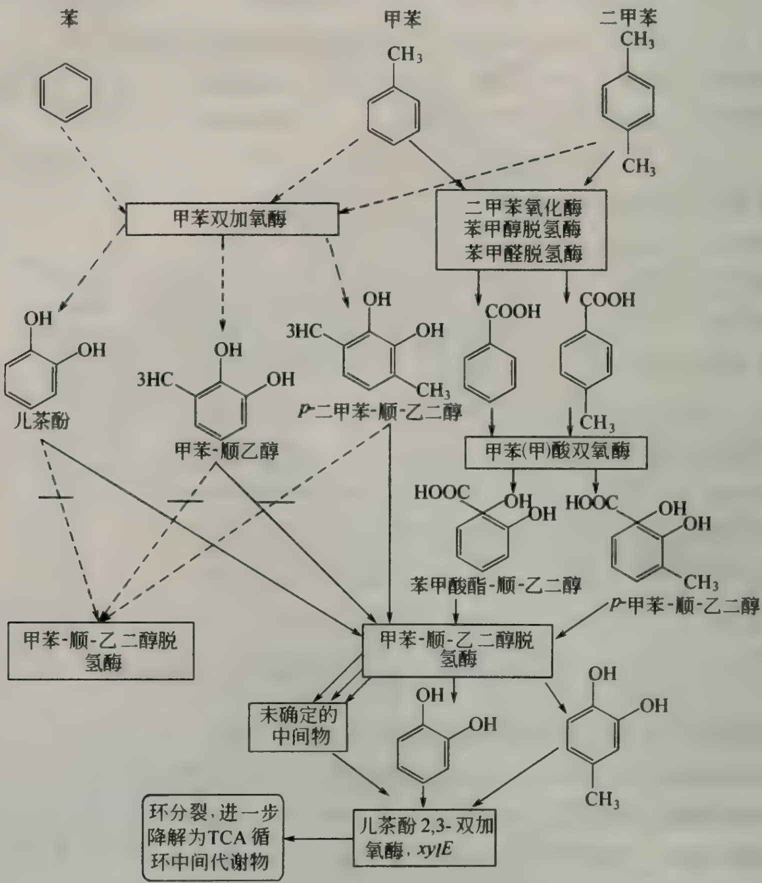


图6.23　*P. putida* 菌降解苯、甲苯和对二甲苯的代谢途径

虚线代表TOD途径，实线代表TOL途径（见表6.7和图6.22）(—)代表TOD途径中的遗传性阻碍（甲苯顺式乙二醇脱氢酶）

这是一个很有意义的例子，它说明了如何对现有的分解代谢质粒（其组成完整的途径）明智地组合，以产生具有新性质的新菌株，例如具有更广泛的底物利用范围或更好的产物形成。

参 考 文 献

Aiba, S., Imanaka, T., & Tsunekawa, H. (1980). Enhancement of tryptophan production in *Escherichia coli* as an application of genetic engineering. *Biotechnology Letters* **2**, 525.

Alderete, J. E., Karl, D. W., & Park, C. -H. (1993). Production of poly (hydroxybutyrate) homopolymer and copolymer from ethanol and propanol in a fed-batch culture. *Biotechnology Progress* **9**, 520-525.

Alterhum, F., & Ingram, L. O. (1989). Efficient ethanol production from glucose, lactose and xylose by recombinant *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology* **55**, 1943-1948.

Anderson, S., Marks, C. B., Lazarus, R., Miller, J., Stafford, K., Seymour, J., Light, D., Rastetter, W.

& Estell, D. (1985). Production of 2-keto-L-gluconate, an intermediate in L-ascorbate synthesis by a genetically modified *Erwinia herbicola*. Science **230**, 144-149.

Anderson, S., Lazarus, R. & Miller, J. (1991). Metabolic pathway engineering to increase production of ascorbic acid intermediates. US Patent 5, 032, 514.

Archer, J. A. C., Solowcordero, D. E. & Sinskey, A. J. (1991). A C-terminal deletion in *Corynebacterium glutamicum* homoserine dehydrogenase abolishes allosteric inhibition by L-threonine. *Gene* **107**, 53.

Aristidou, A. A., Bennett, G. N. & San, K. -Y. (1998). Improvement of biomass yield and recombinant gene expression in *Escherichia coli* by using fructose as the primary carbon source. *Journal of Biotechnology*, in press

Aristidou, A. A., Bennett, G. N. & San, K. -Y. (1994b). Modification of the central metabolic pathways of *Escherichia coli* to reduce acetate accumulation by heterologous expression of the *Bacillus subtilis acetolactate* synthase gene. *Biotechnology and Bioengineering* **44**, 944-951.

Ausich, R. L., Proffitt, J. H. & Yarger, J. G. (1991). Biosynthesis of carotenoids in genetically engineered hosts. *Chemical Abstracts* 116, 35644d.

Barker, D. F. & Campbell, A. M. (1980). Use of the *bio lac* fusion strains to study regulation of biotin synthesis in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology* **143**, 789-800.

Barrere, G. C., Barber, C. E. & Daniels, M. J. (1986). Molecular cloning of genes involved in the production of the extracellular polysaccharide xanthan by *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. *International Journal of Biological Macromolecules* **8**, 372-374.

Bartel, P. L., Zhu, C. -B., Lampel, J. S., Dosch, D. C., Connors, N., Strohl, W. R., Beale, J. M. & Floss, H. G. (1990). Biosynthesis of anthraquinones by interspecies cloning of actinorhodin biosynthesis genes in *Streptomyces*: Clarification of actinorbodin gene functions. *Journal of Bacteriology* **172**, 4816-4826.

Beall, D. S. & Ingram, L. O. (1993). Genetic engineering of soft-rot bacteria for ethanol production from lignocellulose. *Journal of Industrial Microbiology* **11**, 151-155.

Bennett, G. N. & Rudolph, F. B. (1995). The central metabolic pathway from acetyl-CoA to butyryl-CoA in *Clostridium acetobutylicum*. *FEMS Microbiology Reviews* **17**, 241.

Brabetz, W., Liebl, W. & Schleifer, K. -H. (1991). Studies on the utilization of lactose by *Corynebacterium glutamicum*, bearing the lactose operon of *Escherichia coli*. *Archives of Microbiology* **155**, 607-6012.

Brandes, L., Wu, X., Bode, J., Rhee, J. & Schügerl, K. (1993). Fed-batch cultivation of recombinant *Escherichia coli* JM103 and production of the fusion protein SPA: EcoRI in a 60-L working volume airlift tower loop reactor. *Biotechnology and Bioengineering* **42**, 205-214.

Brau, B. & Sahm, H. (1986). Cloning and expression of the structural gene for pyruvate decarboxylase of *Zymomonas mobilis* in *Escherichia coli*. *Archives in Microbiology* **144**, 296-301.

Brown, S. W., Meyer, H. -P. & Fiechter, A. (1985). Continuous production of human leukocyte interferon with *Escherichia coli* and continuous cell lysis in a two stage chemostat. *Applied Microbiology and Biotechnology* **23**, 5-9.

Bull, S. R. (1990). *Energy from Biomass & Wastes XIV*. Chicago: Instiute of Gas Technology.

Bumpus, J. A. & Brock, B. J. (1988). Biodegradation of crystal violet by the white rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*. *Applied and Environmental Microbiology* **54**, 1143-1150.

Burchhardt, G. & Ingram, L. O. (1992). Conversion of xylan to ethanol by ethanologenic strains of *Escherichia coli* and *Klebsiella oxytoca*. *Applied and Environmental Microbiology* **58**, 1128-1133.

Cameron, D. C. & Tong, I. T. (1993). Cellular and metabolic engineering: An overview. *Applied Biochemistry and Biotechnology* **38**, 105-140.

Cane, D. E., Hasler, H., Taylor, P. B. & Liang, T. -C. (1983). Macrolide biosynthesis -Ⅱ: Origin of the carbon skeleton and oxygen atoms of the erythromycins. *Tetrahedron* **39**, 3449-3455.

Cane, D. E., Hasler, H., Taylor, P. B. & Liang, T. -C. (1987). Macrolide biosynthesis-Ⅳ. Intact incorporation of a chain-elongation intermediate into erythromycin. *Journal of the American Chemical Society* **109**, 1255-1257.

Carey, V. C., Walia, S. K. & Ingram, L. O. (1983). Expression of a lactose transposon (Tn951) in *Zymomonas mobilis*. *Applied and Environmental Microbiology* **465**, 1163-1168.

Charter, K. F. (1990). The improving prospects for yield increase by genetic engineering in antibiotic-producing *Streptomyces*. *Bio/Technology* **8**, 115-121.

Chen, R. & Bailey, J. E. (1994). Energetic effect of *Vitreoscilla* hemoglobin expression in *Escherichia coli*: An online ^{31}P NMR saturation transfer study. *Biotechnology Progress* **10**, 360-364.

Cherrington, C. A., Hinton, M., Pearson, G. R. & Chopra, I. (1991). Short-chain organic acids at pH 5.0 kill

Escherichia coli and *Salmonella spp*. without causing membrane perturbation. *Journal of Applied Bacteriology* **70**, 161-165.

Cinco, R. M., MacInnis, J. M. & Greenbaum, E. (1993). The role of carbon dioxide in light-activated hydrogen production by *Chlamydomonas reinhardtii*. *Photosynthesis Research* **38**, 27.

Colón, G. E., Aristidou, A. A., Jetten, M. S. M., Yeni-Komshian, H., Sinskey, A. J. & Stephanopoulos, G. (1997). Disruption of *ilvA* in a *Corynebacterium lactofermentum* threonine producer results in increased threonine production. *Biotechnology Progress*, in press.

Colón, G. E., Follettie, M. T., Jetten, M. S. M., Stephanopoulos, G. & Sinskey, A. J. (1993). Redirections of carbon flux at a *Corynebacterium glutamicum* threonine metabolic branch point by controlled enzyme overexpression. In *Annual ASM Meeting*, pp. 320.

Colón, G. E., Jetten, M. S. M., Nguyen, T. T., Gubler, M. E., Sinskey, A. J. & Stephanopoulos, G. (1995). Effect of inducible *thrB* expression on amino acid production in *Corynebacterium lactofermentum* 21799. *Applied and Environmental Microbiology* **61**, 74-78.

Colón, G, E., Nguyen, T. T., Jetten, M. S. M., Sinskey, A. J. & Stephanopoulos, G. (1995b). Production of isoleucine by overexpression of *ilvA* in a *Corynebacterium lactofermentum* threonine producer. *Applied Microbiology and Biotechnology* **43**, 482.

Cordes, C., Möckel, B., Eggeling, L. & Sahm, H. (1992). Cloning, organization and functional analysis of *ilvA*, *ilvB* and *ilvC* genes from *Corynebacterium glutamicum*. *Gene* **112**, 113.

Csonka, L. N. & Clark, A. J. (1979). Deletions generated by the transposon *Tn*10 in the *srl recA* region of the *Escherichia coli* K-12 chromosome. *Genetics* **93**, 321-343.

Curless, C. E., Forrer, P. D., Mann, M. B., Fenton, D. M. & Tsai, L. B. (1988). Chemostat study of kinetics of human lymphokine synthesis in recombinant *Escherichia coli*. *Biotechnology and Bioengineering* **34**, 415-421.

Dahiya, J. S. (1991). Xylitol production by *Petromyces albertensis* grown on medium containing D-xylose. *Canadian Journal of Microbiology* **37**, 14-18.

DeModena, J. A., Gutierrez, S., Velasco, J., Fernandez, F. J., Fachini, R. A. & Galazzo, J. L. (1993). The production of cephalosporin C by *Acremonium chrysogenum* is improved by the intracellular expression of a bacterial hemoglobin. *Bio/Technology* **11**, 926-929.

Diaz-Ricci, J. C., Hiltzmann, B., Rinas, U. & Bailey, J. E. (1990). Comparative studies of glucose catabolism by *Escherichia coli* grown in complex medium under aerobic and anaerobic conditions. *Biotechnology Progress* **6**, 326-332.

Diderichsen, B. (1986). A genetic system for stabilization of cloned genes in *Bacillus subtilis*. In *Bacillus Molecular Genetics and Biotechnology Applications*, pp. 35-46. Edited by A. T. Ganesan & J. A. Hoch. Orlando, FL: Academic Press.

Dills, S. S., Apperson, A., Schmidt, M. R. & Saier, M. H., Jr. (1980). Carbohydrate transport in bacteria. *Microbiological Reviews* **44**, 385-418.

Durre, P., Fischer, R. -J., Kuhn, A., Lorenz, K., Schreiber, W., Sturzenhofecker, B., Ullmann, S., Winzer, K. & Sauer, U. (1995). Solventogenic enzymes of *Clostridium acetobutylicum*: Catalytic properties, genetic organization, and transcriptional regulation. *FEMS Microbiology Reviews* **17**, 251.

Eggersdorfer, M., Meyer, J. & Eckes, P. (1992). Use of Renewable Resources for Non-Food Materials. *FEMS Microbiology Reviews* **103**, 355-364.

Eikmanns, B., Metz, M., Reinscheid, D., Kricher, M. & Sahm, H. (1991). Amplification of three threonine biosynthetic genes in *Corynebacterium glutamium* and its influence on carbon flux in different strains. *Applied Microbiology and Biotechnology* **34**, 617.

Emodi, A. (1978). Xylitol: Its properties and food applications. *Food Technology* **32**, 20-32.

Ensley, B. D. (1985). Microbial production of indigo. US Patent **4**, 520, 103.

Feldmann, S., Sprenger, G. A. & Sahm, H. (1989). Ethanol production from xylose with a pyruvate-formate-lyase mutant of *Klebsiella planticola* carrying a pyruvate-decarboxylase gene from *Zymomonas mobilis*. *Applied Microbiology and Biotechnology* **31**, 152-157.

Feldmann, S., Sahm, H. & Sprenger, G. A. (1992). Pentose metabolism in *Zymomonas mobilis* wild type and recombinant strains. *Applied Microbiology and Biotechnology* **38**, 354.

Flores, N., Xiao, J., Berry, A., Bolivar, F. & Valle, F. (1996). Pathway engineering for the production of aro-

matic compounds in *Escherichia coli*. *Nature Biotechnology* **14**, 620-623.

Follettie, M. T., Shin, H. K. & Sinskey, A. J. (1988). Organization and regulation of the *Corynebacterium glutamicum hom-thrB* and *thrB* loci. *Molecular Microbiology* **2**, 53.

Fu, J. -F. & Tseng, Y. -H. (1990). Construction of lactose-utilizing *Xanthomonas campestris* and production of xanthan gum from whey. *Applied and Environmental Microbiology* **56**, 919-923.

Gerdes, K. (1988). The *parB* (*hok/sok*) locus of plasmid R1: A general purpose plasmid stabilization system. *Bio/Technology* **6**, 1402-1405.

Gerdes, K., Rasmussen, P. B. & Molin, S. (1986). Unique type of the plasmid maintenance function: Postsegregational killing of plasmid-free cells. *Proceedings of the National Academy of Science* **83**, 3116-3120.

Gloecker, R., Ohsawa, I., Speck, D., Ledoux, C., Bernand, S., Zinsius, M., Villeval, D., Kisou, T., Kamogawa, K. & Lemoine, Y. (1990). Cloning and characterization of the *Bacillus sphaericus* genes controlling the bioconversion of pimelate into desthiobiotion. *Gene* **87**, 63-70.

Gong, C. H., Chen, L. F. & Tsao, G. T. (1981). Quantitative production of xylitol from D-xylose by a high-xylitol producing yeast mutant *Candida tropicalis* HXP2. *Biotechnology Letters* **3**, 130-135.

Goodman, A. E., Strzelecki, A. T. & Rogers, P. L. (1984). Formation of ethanol from lactose by *Zymomonas mobilis*. *Journal of Biotechnology* **1**, 219-228.

Greenbaum, E., Lee, J. W., Tevault, C. V., Blankinship, S. L. & Mets, L. J. (1995). CO_2 fixation and photoevolution of H_2 and O_2 in a mutant of *Chlamydomonas* lacking photosystem I. *Nature* **376**, 438.

Grindley, J. F., Payton, M. A., van de Pol, H. & Hardy, K. G. (1988). Conversion of glucose to 2-keto-L-gluconate, an intermediate in L-ascorbate synthesis, by a recombinant strain of *Erwinia citreus*. *Applied and Environmental Microbiology* **54**, 1770-1775.

Hahn-Hägerdal, B., Jeppsson, H., Olsson, L. & Mohagheghi, A. (1993). An Interlaboratory Comparison of the Performance of Ethanol-Producing Microorganisms in a Xylose-Rich Acid Hydrolysate. *Applied Microbiology and Biotechnology* **41**, 62-72.

Hallborn, J., Walfridsson, M., Airaksinen, U., Ojamo, H., Hahn-Hägerdal, B., Penttilä, M. & Keränen, S. (1991). Xylitol Production by Recombinant *Saccharomyces cerevisiae*. *Bio/Technology* **9**, 1090-1095.

Han, K. -S., Archer, J. A. C. & Sinskey, A. J. (1990). The molecular structure of the *Corynebacterium glutamicum* threonine synthase gene. *Molecular Microbiology* **4**, 1693.

Harding, N. E., Cleary, J. M., Cabana, D. K., Rosen, I. G. & Kang, K. S. (1987). Genetic and physical analyses of a cluster of genes essential for xanthan gum biosynthesis in *Xanthomonas campestris*. *Journal of Applied Bacteriology* **169**, 2854-2861.

Hardy, K. G., van de Pol, H., Grindley, J. F. & Payton, M. A. (1990). Production of viamin C precursor using genetically modified organisms. U. S. Patent 4, 945, 052.

Hollenberg, C. P. & Sahm, H. (1988). Biosensors and environmental biotechnology. In *Biotech*, pp. 150. New York: Gustav Fischer.

Hollenberg, C. P. & Strasser, A. W. M. (1990). Improvement of baker's and brewer's yeast by gene technology. *Food Biotechnology* **4**, 527-534.

Hopwood, D. A., Malpartida, F., Kieser, H. M., Ikeda, H., Duncan, J., Fujii, I., Rudd, B. A. M., Floss, H. G. & Omura, S. (1985). Production of hybrid antibiotics by genetic engineering. *Nature* **314**, 642-646.

Horitsu, H., Yahashi, Y., Takamizawa, K., Kawai, K., Suzuki, T. & Watanabe, N. (1992). Production of xylitol from D-xylose by *Candida troplicalis*: Optimization of production rates. *Biotechnology and Bioengineering* **40**, 1085-1091.

Hutchinson, C. R. & Fujii, I. (1995). Polyketide synthase gene manipulation: A structure-function approach in engineering novel polyketides. *Annual Reviews in Microbiology* **49**, 201-238.

Ikeda, M. & Katsumata, R. (1992). Metabolic engineering to produce tyrosine or phenylalanine in a tryptophan-producing *Corynebacterium glutamicum* strain. *Applied and Environmental Microbiology* **58**, 781-785.

Ingram, L. O. & Conway, T. (1988). Expression of different levels of ethanolgenic enzymes from *Zymomonas mobilis* in recombinant strains of *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology* **54**, 397-404.

Ingram, L. O., Conway, T., Clark, D. P., Sewell, G. W. & Preston, J. F. (1987). Genetic engineering of ethanol production in *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology* **53**, 2420-2425.

Innis, M. A., Holland, M. J., McCabe, P. C., Cole, G. E., Wittman, V. P., Tall, R., Watt, K. W. K.,

Gelfand, D. H., Holland, J. P. & Meade, J. H. (1985). Expression, glycosylation and secretion of an *Aspergillus* Glucoamylase by *Saccharomyces cerevisiae*. *Science* **228**, 21-26.

Izumi, Y., Kano, Y., Inagaki, K., Tani, Y. & Yamada, H. (1981). Characterization of biotin biosynthetic enzymes of *Bacillus sphaericus*: A dethiobiotin producing bacterium. *Agricultural and Biological Chemistry* **45**, 1983-1989.

Izumori, K. & Tuzaki, K. (1988). Production of xylitol from D-xylose by *Mycobacterium smegmatis*. *Journal of Fermentation Technology* **66**, 33-36.

Jensen, E. B. & Carlsen, S. (1990). Production of recombinant human growth hormone in *Escherichia coli*: Expression of different precursors and physiological effects of glucose, acetate, and salts. *Biotechnology and Bioengineering* **36**, 1-11.

Jetten, M. S. M. & Sinskey, A. J. (1995). Recent advances in the physiology and genetics of amino acid-producing bacteria. *Critical Reviews in Biotechnology* **15**, 73.

Jetten, M. S. M., Gubler, M. E., McCormick, M. M., Colón, G. E., Follettie, M. T. & Sinskey, A. J. (1993). Molecular organization and regulation of the biosynthetic pathway for aspartate derived amino acids in *Corynebacterium glutamicum*. In *Industrial Microorganisms: Basic and Applied Molecular Genetics*, pp. 97. Edited by R. H. Batltz, G. Hegeman & P. L. Skatrud. Washington, D. C.: ASM.

Johansen, L., Bryn, K. & Störmer, F. C. (1975). Physiological and biochemical role of the butanediol pathway in *Aerobacter* (*Enterobacter*) *aerogens*. *Journal of Bacteriology* **123**, 1124-1130.

Kado, C. I. (1992). Plant pathogenic bacteria. In *The Prokaryotes*, pp. 659-674. Edited by A. Balows, H. G. Truper, M. Dworkin, W. Harder & K. -H. Scheifer. New York: Springer-Verlag.

Kalio, P. T., Kim, D. J., Tsai, P. S. & Bailey, J. E. (1994). Intracellular expression of *Vitreoscilla* hemoglobin alters *Escherichia coli* energy metabolism under oxygen-limited conditions. *European Journal of Biochemistry* **219**, 201-208.

Kanamayia, H., Sode, K., Yakamoto, T. & Kurube, I. (1988). *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews* **6**, 379-401.

Kao, C. M. -F. (1997). Structure, function and engineering of modular polyketide synthases. Ph. D. Thesis, Department of Chemical Engineering, Stanford University, Palo Alto, CA.

Keilhauer, C., Eggeling, L. & Sahm, H. (1993). Isoleucine synthesis in *Corynebacterium glutamicum*: Molecular analysis of the *ilvB-ilvN-ilvC* operon. *Journal of Bacteriology* **175**, 5595.

Keim, C. R. & Venkatasubramanian, K. (1989). Economics of current biotechnological methods of producing ethanol. *Trends in Biotechnology* **7**, 22-29.

Kennedy, J. F., Cabalda, V. M. & White, C. A. (1988). Enzymatic starch utilization and genetic engineering. *Trends in Biotechnology* **6**, 184-189.

Khosla, C. & Bailey, J. E. (1988). Heterologous expression of a bacterial hemoglobin improves the growth properties of recombinant *Escherichia coli*. *Nature* **331**, 633-635.

Khosla, C. & Bailey, J. E. (1988b). The *Vitreoscilla* hemoglobin gene: Molecular cloning, nucleotide sequence, and genetic expression in *Escherichia coli*. *Molecular and General Genetics* **214**, 158-161.

Khosravi, M., Webster, D. A. & Stark, B. C. (1990). Presence of bacterial hemoglobin gene improves α-amylase production of a recombinant *Escherichia coli* strain. *Plasmid* **24**, 190-194.

Kilbane, J. J., Chatterjee, D. K. & Chakrabarty, A. M. (1983). Detoxification of 2,4,5-trichlorophenoxyacetic acid from contaminated soil by *Pseudomonas cepacia*. *Applied and Environmental Microbiology* **45**, 1697-1700.

Kinoshita, S., Nakayama, K. & Udaka, S. (1957). Studies on the amino acid fermentations. Part Ⅰ. Production of L-glutamic acid by various microorganisms. *Journal of General and Applied Microbiology* **3**, 193-205.

Kitani, O. & Hall, C. W. (1989). *Biomass Handbook*. New York: Gordon and Breach Science Publishers.

Koch, A. K., Reiser, J., Käppeli, O. & Firchter, A. (1988). Genetic construction of lactose-utilizing strains of *Pseudomonas aeruginosa* and their application in biosurfactant production. *Bio/Technology* **6**, 1335-1339.

Kötter, P., Amore, R., Hollenberg, C. P. & Ciriacy, M. (1990). Isolation and characterization of the *Pichia stipitis* xylitol dehydrogenase gene, XYL2, and construction of a xylose-utilizing *Saccharomyces cerevisiae* transformant. *Current Genetics* 18, 493-500.

Kumar, V., Ramakrishnan, S., Teeri, T. T., Knowles, J. K. C. & Hartey, B. S. (1992). *Saccharomyces cerevisiae* cells secreting an *Aspergilus niger* β-galactosidase grown on whey permeate. *Bio/Technology* **10**, 82-85.

Laban, A. & Cohen, A. (1981). Interplasmidic and intraplasmidic recombination in *Escherichia coli* K-12. *Molecular*

and General Genetics **184**, 200-207.

Laboratory, National Renewable Energy(1996). Ethanol production from lignocellulose. In *The Eighteenth Annual Meeting on Fuels & Chemical From Biomass*. Edited by B. Davison & C. Wayman. Gatlinburg, Tennessee.

Ladisch, M. R., Lin, K. W., Voloch, M. & Tsao, G. T. (1983). Process considerations in the enzymatic hydrolysis of biomass. *Enzyme and Microbial Technology* **5**, 82-102.

Lawlis, V. B., Dennis, M. S., Chem, E. Y., Smith, D. H. & Henner, D. J. (1984). Cloning and sequencing of the xylose isomerase and the xylulose kinase genes of *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology* **47**, 15-21.

Lee, J. W., Tevault, C. V., Blankinship, S. L., Collins, R. T. & Greenbaum, E. (1994a). Photosynthetic water splitting: In situ photoprecipitation of metallocatalysts for photoevolution of hydrogen and oxygen. *Energy & fuels: An American Chemical Society Journal* **8**, 770-773.

Lee, J. -Y., Roh, J. -R. & Kim, H. -S. (1994b). Metabolic engineering of *Pseudomonas putida* for the simultaneous biodegiadation of benzene , toluene , and *p*-xylene mixture. *Biotechnology and Bioengineering* **43**, 1146-1152.

Lee, J. W., Blankinship, S. L. & Greenbaum, E. (1995). Temperature effect on production of hydrogen and oxygen by *Chlamydomonas* cold strain CCMP1619 and wild type 137c. *Applied Biochemistry and Biotechnology* **51-52**, 379.

Lindsay, K. F. (1992). "Truly degradable" resins are now truly commercial. *Modern Plastics* **2**, 62-64.

Liu, S. -C., Webster, D. A., Wei, M. -L. & Stark, B. C. (1996). Genetic engineering to contain the *Vitreoscilla* hemoglobin gene enhances degradation of benzoic acid by *Xanthomonas maltophilia*. *Biotechnology and Bioengineering* **49**, 101-105.

Luli, G. W. & Strohl, W. R. (1990). Comparison of growth, acetate production and acetate inhibition of *Escherichia coli* strains in batch and fed-batch fermentations. *Applied and Environmental Microbiology* **56**, 1004-1011.

Lynd, L. R., Cushman, J. H., Nichols, R. J. & Wyman, C. E. (1991). Fuel Ethanol from cellulosic biomass. *Science* **251**, 1318-1323.

Magnolo, S. K., Leenutaphong, D. L., DeModena, J. A., Curtis, J. E., Bailey, J. E. & Galazzo, J. L. (1991). Actinorhodin production by *Streptomyces coelicitor* and growth of *Streptomyces lividans* are improved by expression of a bacterial hemoglobin. *Bio/Technology* **9**, 473-476.

Marzocca, M. P., Harding, N. E., Petroni, E. A., Cleary, J. M. & Ielpi, L. (1991). Location and cloning of the ketal pyruvate transferase gene of *Xanthomonas campestris*. *Journal of Bacteriology* **173**, 7519-7524.

McAlpine, J. B., Tuan, J. S., Brown, D. P., Grebner, K. D., Whitern, D. N., Bako, A. & Katz, L. (1987). New antibiotics from genetically engineered *Actinomycetes*. I. 2-Nonerythromycins, isolation and structural determination. *Journal of Antibiotics* **40**, 1115-1122.

McDaniel, R., Ebert-Khosla, S., Hopwood, D. A. & Khosla, C. (1993). Engineering biosynthesis of novel polyketides. *Science* **262**, 1546-1550.

McDaniel, R., Ebert-Khosla, S., Hopwood, D. A. & Khosla. C. (1994). Engineering biosynthesis of novel polyketides: Influence of a downstream enzyme on the catalytic specificity of a minimal aromatic polyketide synthase. *Proceedings of the National Academy of Science USA* **91**, 11542-11346.

Mermelstein, L. D., Welker, N. E., Bennett, G. N. & Papoutsakis, E. T. (1992). Expression of cloned homologous fermentative genes in *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824 for. *Bio/Technology* **10**, 190-195.

Meyrial, V., Delgenes, J. P., Moletta, R. & Navarro, J. M. (1991). Xylitol production from D-xylose by *Candida guillermondii*: Fermentation behaviour. *Biotechnology Letters* **13**, 281-286.

Misawa, N., Nakagawa, M., Kobayashi, K., Yamano, S., Izawa, Y., Nakamura, K. & Harashima, K. (1990). Elucidation of the *Erwinia uredovora* carotenoid biosynthesis pathway by functional analysis of gene products expressed in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology* **172**, 6704-6712.

Misawa, N., Yamano, S. & Ikenaga, H. (1991). Production of β-carotene in *Zymomonas mobilis* and *Agrobacterium tumefaciens* by introduction of the biosynthetic genes from *Erwinia uredovora*. *Applied and Environmental Microbiology* **57**, 1847-1849.

Mori, M., Yokota, A., Sugitomo, S. & Kawamura, K. (1987). Process for the isolation of a strain with reduced pyruvate kinase activity or completely lacking it. Japanese Patent JP **62**, 205, 782.

Murdock, D., Ensley, B. D., Serdar, C. & Thalen, M. (1993). Construction of metabolic operons catalyzing the *de novo* biosynthesis if indigo in *Escherichia coli*. *Bio/Technology* **11**, 381-386.

Nawrath, C., Poirier, Y. & Somerville, C. (1994). Targeting of the polyhydroxybutyrate biosynthetic pathway to the

plastids of *Arabidopsis thaliana* results in high levels of polymer accumulation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 91, 12760.

Ninet, L. & Renaut, J. (1979). Carotenoids. In *Microbial Processes*. pp. 529-544. Edited by H. J. Peppler & D. Perlman. New York: Academic Press, Inc.

Nishio, N., Sugawa, K., Hayase, N. & Nagai, S. (1989). Conversion of D-xylose into xylitol by immobilized cells of *Candida pelliculosa* and *Methanobacterium* sp. HU. *Journal of Fermentation and Bioengineering* **67**, 356-360.

Ohta, K., Bell, D. S., Mejia, J. P., Shanmugam, K. T. & Ingram, L. O. (1991a). Genetic improvement of *Escherichia coli* for ethanol production: Chromosomal integration of *Zymomonas mobilis* genes encoding pyruvate decarboxylase and alcohol dehydrogenase. Ⅱ. *Applied and Environmental Microbiology* **57**, 893-900.

Ohta, K., Beall, D. S., Mejia, J. P., Shanmugam, K. T. & Ingram, L. O. (1991b). Metabolic engineering of *Klebsiella oxytoca* M5A1 for ethanol production from xylose and glucose. *Applied and Environmental Microbiology* **57**, 2810-2815.

Onken, U. & Leifke, E. (1989). Effect of total and partial pressure (oxygen and carbon dioxide) on aerobic microbial processes. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology* **40**, 137-169.

Papoutsakis, E. T. & Bennett, G. N. (1991). Cloning, structure and expression of acid and solvent pathway genes of *Clostridium acetobutylicum*. In *The Clostridia and Biotechnology*. Edited by D. R. Wood. Oxford, UK: Butterworths.

Patnaik, R. & Liao, J. C. (1994). Engineering of *Escherichia coli* central metabolism for aromatic metabolite production with near theoretical yield. *Applied and Environmental Microbiology* **60**, 3903-3908.

Patnaik, R., Spitzer, R. G. & Liao, J. C. (1995). Pathway engineering for production of aromatics in *Escherichia coli*: Confirmation of stoichiometric analysis by independent modulation of AroG, TktA and Pps activities. *Biotechnology and Bioengineering* **46**, 361-370.

Peoples, O. P. & Sinskey, A. J. (1989). Poly-β-hydroxybutyrate biosynthesis in *Alcaligenes eutrophus* H16. Identification and characterization of the PHB polymerase gene (*phbC*). *Journal of Biological Chemistry* **264**, 15298-15303.

Peoples, O. P. & Sinskey, A. J. (1990). Novel biodegradable microbial polymers. In Proceedings of the NATO Advanced Research Workshop on New Biosynthetic, Biodegradable Polymers of Industrial Interest from Microorganisms. Edited by E. A. Dawes. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers.

Peoples, O. P., Liebl, W., Bodis, M., Maeng, P. J., Follettie, M. T., Archer, J. A. C. & Sinskey, A. J. (1988). Nucleotide sequence and fine structural analysis of the *Corynebacterium glutamicum hom-thrB* operon. *Molecular Microbiology* **2**, 63.

Poirier, Y., Dennis, D. E., Klomparens, K. & Somerville, C. (1992). Polyhydroxybutyrate, a biodegradable thermoplastic, produced in transgenic plants. *Science* **256**, 250-253.

Postma, P. W., Lengeler, J. W. & Jacobson, G. R. (1993). Phosphoenolpyruvate: carbohydrate phosphotransferase systems of bacteria. *Microbiological Reviews* **57**, 543-594.

Pries, A., Steinbüchel, A. & Schlegel, H. G. (1990). Lactose-and galactose-utilizing strains of poly (hydroxyalkanoic acid) -accumulating *Alcaligenes eutrophus* and *Pseudomonas saccharophila* obtained by recombinant DNA technology. *Applied Microbiology and Biotechnology* **33**, 410-417.

Ramos, J. L. &Timmis, K. N. (1987). Experimental evolution of catabolic pathways in bacteria. *Microbiological Science* **4**, 228-237

Reinscheid, D. J., Eikmanns, B. J. & Sahm, H. (1991). Analysis of *Corynebacterium glutamicum hom* gene coding for a feedback resistant homoserine dehydrogenase. *Journal of Bacteriology* 173, 3228.

Reinscheid, D. J., Eikmanns, B. J. & Sahm, H. (1994). Stable expression of *hom1-thrB* in *Corynebacterium glutamicum* and its effect on the carbon flux to threonine and related amino acids. *Applied and Environmental Microbiology* **60**, 126-132.

Rojo, F., Pieper, D. H., Engesser, K. H., Knackmuss, H. M. & Timmis, K. N. (1987). Assemblage of *ortho*-clevage route for simultaneous degradation of chloro-and methylaromatics. *Science* **235**, 1395-1398.

Rygus, T., Scheler, A., Allmansberger, R. & Hillen, W. (1991). Molecular cloning, structure, promoters and regulatory elements for transcription of the *Bacillus megaterium* encoded regulon for xylose utilization. *Archives in Microbiology* **155**, 535-542.

Sabatié, J., Speck, D., Reymund, J., Hebert, C., Caussin, L., Weltin, D., Gloeckler, R., O'Regan, M., Bernard, S., Ledoux, C., Ohsawa, I., Kamogawa, K., Lemoine, Y. & Brown, S. W. (1991). Biotin for-

mation by recombinant strains of *Escherichia coli*: Influence of the host physiology. *Journal of Biotechnology* **20**, 29-50.

Saier, M. H, Jr., M. H., Yamada, M., Erni, B., Suda, K., Lengeler, J., Ebner, R., Argos, P., Rak, B., Schnetz, K., Lee, C. A., Stewart, G. C., Breidt, F., Waygood, E. B., Peri, K. G. & Doolittle, R. F. (1988). Sugar permeases of the bacterial phosphoenolpyruvate-dependent phosphotransferase system: Sequence comparisons. *FASEB Journal* **2**, 199-208.

Sarthy, A. V., McConaughy, B. L., Lobo, Z., Sundstrom, J. A., Furlong, C. E. & Hall, B. D. (1987). Expression of the *Escherichia coli* xylose isomerase gene in *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied and Environmental Microbiology* **53**, 1996-2000.

Sauer, U. & Duerre, P. (1995). Differential induction of genes related to solvent formation during the shift from acidogenesis to solventogenesis in continuous culture of *Clostridium acetobutylicum*. *FEMS Microbiology Letters* **125**, 115.

Schubert, P., Steinbüchel, A. & Schlegel, H. G. (1988). Cloning of the *Alcaligenes eutrophus* genes for synthesis of poly-β-hydroxybutyrate (PHB) and synthesis of PHB in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology* **170**, 5837-5847.

Shen, B. & Hutchinson, C. R. (1996). Deciphering the mechanism for the assembly of aromatic polyketides by a bacterial polyketide synthase. *Proceedings of the National Academy of Science USA* **93**, 6600-6604.

Shio, I. (1986). Production of individual amino acids: Tryprophan, phenylalanine and tyrosine. In *Biotechnology of Amino Acid Production*, pp. 188-206. Edited by K. Aida, I. Chibata, K. Nakayama, K. Takinami & H. Yamada, Tokyo: Elsevier.

Skatrud, P. L., Tietz, A. J., Ingolia, T. D., Cantwell, C. A., Fisher, D. L., Chapman, J. L. & Queener, S. W. (1989). Use of recombinant DNA to improve production of cephalosporin C by *Cephalosporium acremonium*. *Bio/Technology* **7**, 477-485.

Skogman, G., Nilsson, J. & Gustafsson, P. (1983). The use of a partitioning locus to increase stability of tryptophan-operon bearing plasmids in *E. coli*. *Gene* **23**, 105-115.

Slater, S. C., Voige, W. H. & Dennis, D. E. (1988). Cloning and expression in *Escherichia coli* of the *Alcaligenes eutrophus* H16 poly-β-hydroxybutyrate biosynthetic pathway. *Journal of Bacteriology* **170**, 4431-4436.

Slater, S. C., Gallaher, T. & Dennis, D. E. (1992). Production of poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) in a recombinant *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology* **58**, 1089-1094.

Slonczewski, J. L., Rosen, B. P., Alger, J. R. & Macnab, R. M. (1981). pH homeostasis in *Escherichia coli*: Measurement by ^{31}P nuclear magnetic resonance of methylphosphonate and phosphate. *Proceedings of the National Academy of Science USA* **78**, 6271-6275.

Spindler, D. D., Wyman, C. E., Grohmann, K. & Philippidis, G. P. (1992). Evaluation of the cellobiose-fermenting yeast *Brettanomyces custersii* in the simultaneous saccharification and fermentation of cellulose. *Biotechnology Letters* **14**, 403-407.

Starrenburg, M. J. C. & Hugenholtz, J. (1991). Citrate fermentation by *Lactococcus* and *Leuiconostoc* spp. *Applied and Environmental Microbiology* **57**, 3535-3540.

Steinbüchel, A. (1991). Polyhydroxyalkanoic acids. In *Novel Biomaterials from Biological Sources*. Edited by D. Byrom. New York: MacMillan.

Störmer, F. C. (1968). The pH 6 acetolactate-forming enzyme from *Aerobacter aerogenes*. II. Evidence that it is not a flavoprotein. *Journal of Biological Chemistry* **243**, 3740-3741.

Summers, R. G., Wendt-Pienkowski, E., Motamedi, H. & Hutchinson, C. R. (1992). Nucleotide sequence of the *tcm* II-*tcm* IV region of the tetracenomycin C biosynthetic gene cluster of *Streptomyces glaucescens* and evidence that the *tcmN* gene encodes a multifunctional cyclasedehydratase-O-methyl transferase. *Journal of Bacteriology* **174**, 1810-1820.

Taguchi, F., Mizukami, N., Yamada, K., Hasegawa, K. & Saito-Taki, T. (1995). Direct conversion of cellulosic materials to hydrogen by *Clostridium* sp. strain no. 2. *Enzyme and Microbial Technology* **17**, 147-150.

Takahashi, D. F., Carvalhal, M. L. & Alterhum, F. (1994). Ethanol production from pentoses and hexoses by recombinant *Escherichia coli*. *Biotechnology Letters* **16**, 747-750.

Tantirungkij, M., Nakashima, N., Seki, T. & Yoshida, T. (1993). Construction of xylose-assimilating *Saccharomyces cerevisae*. *Journal of Fermentation and Bioengineering* **75**, 83-88.

Tantirungkij, M., Seki, T. & Yoshida, T. (1994). Genetic improvement of *Saccharomyces cerevisiae* for ethanol production from xylose. *Annals of the New York Academy of Science* **721**, 138-147.

Timm, A. & Steinbüchel, A. (1990). Formation of polyesters consisting of medium-chain-length 3-hydroxyalkanoic acids from gluconate by *Pseudomonas aeruginosa* and other fluorescent pseudomonads. *Applied and Environmental Microbiology* **56**, 3360-3367.

Tolan, J. S. & Finn, R. K. (1987). Fermentation of D-xylose and L-arabinose to ethanol by *Erwinia chrysanthemi*. *Applied and Environmental Microbiology* **53**, 2033-2038.

Tolan, J. S. & Finn, R. K. (1987). Fermentation of D-xylose to ethanol by *Genetically Modified Klebsiella planticola*. *Applied and Environmental Microbiology* **53**, 2039-2044.

Tong, I. -T. & Cameron, D. C. (1992). Enhancement of 1,3-propanediol production by cofermentation in *Escherichia coli* expressing *Klebsiella pneumoniae dha* regulon genes. *Applied Biochemistry and Biotechnology* **34/35**, 149-158.

Tong, I., Liao, H. H. & Cameron, D. C. (1991). Propanediol production by *Escherichia coli* expressing genes from the *Klebsiella pneumoniae dha* regulon. *Applied and Environmental Microbiology* **57**, 3541-3546.

Tsai, P. S., Hatzimanikatis, V. & Bailey, J. E. (1995a). Effect of *Vitreoscilla* hemoglobin dosage on microaerobic *Escherichia coli* carbon and energy metabolism. *Biotechnology and Bioengineering* **49**, 139-150.

Tsai, P. S., Nägeli, M. & Bailey, J. E. (1995b). Intracellular expression of *Vitreoscilla* hemoglobin modifies microaerobic *Escherichia coli* metabolism through elevated concentration and specific activity of cytochrome o. *Biotechnology and Bioengineering* **49**, 151-160.

Tsai, P. S., Rao, G. & Bailey, J. E. (1995c). Improvement of *Escherichia coli* microaerobic metabolism by vitreoscilla hemoglobin: New insights from NAD(P)H fluorescence and culture redox potential. *Biotechnology and Bioengineering* **47**, 347-354.

Tsoi, C. & Khosla, C. (1995). Combinatorial biosynthesis of "unnatural" products: The polyketide example. *Chemical Biology* 2.

Tsunekawa, H., Azuma, S., Okabe, M., Okamoto, R. & Aiba, S. (1992). Acquisition of sucrose utilization system in *Escherichia coli* K-12 derivatives and its application to industry. *Applied and Environmental Microbiology* **56**, 2081-2088.

Uhlenbusch, I., Sahm, H. & Sprenger, G. A. (1991). Expression of an L-alanine dehydrogenase gene in *Zymomonas mobilis* and excretion of L-alanine. *Applied and Environmental Microbiology* **57**, 1360-1366.

Verduyn, C., van Kleff, R., Schreuder, H., van Dijken, J. P. & Scheffers, W. A. (1985). Properties of the NAD(P)H-dependent xylose reductase from the xylose fermenting yeast *Pichia stipitis*. *Biochemical Journal* **226**, 669-677.

Vongsuvanlert, V. & Tani, Y. (1989). Xylitol production by a methanol yeast, *Candida boidinii*. *Journal of Fermentation and Bioengineering* **37**, 35-39.

von Sivers, M. & Zacchi, G. (1995). A techno-economical comparison of three processes for the production of ethanol from pine. *Bioresource Technology* **51**, 43.

von Sivers, M., Zacchi, G., Olsson, L. & Hahn-Hägerdal, B. (1994). Cost analysis of ethanol production from willow using recombinant *Escherichia coli*. *Biotechnology Progress* **10**, 555-560.

von Stockar, U. & Marison, I. M. (1990). Unconventional utilization of whey in Switzerland. In *Bioprocess Engineering*, pp. 343-365. Edited by K. Tarun & E. Ghose.

Windass, J. D., Worsey, M. J., Pioli, E. M., Pioli, D., Barth, P. T., Atherton, K. T. & Dart, E. C. (1980). Improved converison of methanol to single-cell protein by *Methyllophilus methylotrophus*. *Nature* **287**, 396-401.

Wood, W. A. (1961). Fermentation of carbohydrates and related compounds. In *The Bacteria*, *Vol* Ⅱ: *Metabolism*, pp. 59-149. Edited by I. C. Gunsalus & R. Y. Stanier. London: Academic Press.

Wood, B. E. & Ingram, L. O. (1992). Ethanol production from cellobiose, amorphous cellulose, and crystalline cellulose by recombinant *Klebsiella oxytoca* containing chromosomally integrated *Zymomonas mobilis* genes for ethanol production and plasmids expressing thermostable cellulase genes from *Clostridium thermocellum*. *Applied and Environmental Microbiology* **58**, 2103-2110.

Woodward, J., Mattingly, S. M., Danson, M., Hough, D., Ward, N. & Adams, M. (1996). *In vitro* hydrogen production by glucose dehydrogenase and hydrogenase. *Nature Biotechnology* **14**, 872-874.

Yanase, H., Kurii, J. & Tonomura. K. (1988). Fermentation of lactose by *Zymomonas mobilis* carrying a Lac+ recombinant plasmid. *Journal of Fermentation Technology* **66**, 409-415.

Yee, L. & Blanch, H. W. (1992). Recombinant protein expression in high cell density fed-batch cultures of *Es-*

cherichia coli. *Bio/Technology* **10**, 1550-1556.

Yoshitake, J., Ohiwa, H. & Shimamura, M. (1971). Production of polyalcohols by a *Corynebacterium* sp. Part Ⅰ. Production of pentitol from aldopentose. *Agricultural and Biological Chemistry* **35**, 905-911.

Yoshitake, J., Ishizaki, H., Shimamura, M. & Imai, T. (1973). Xylitol production by an *Enterobacter* species. *Agricultural and Biological Chemistry* **37**, 2261-2267.

Zabriskie, D. W. & Arcuri, E. J. (1986). Factors influencing productivity of fermentations employing recombinant microorganisms. *Enzyme and Microbial Technology* **16**, 933-941.

Zhang, M., Eddy, C., Deandra, K., Finkelstein, M. & Picataggio, S. (1995). Metabolic engineering of a pentose metabolism pathway in ethanologenic *Zymomonas mobilis*. *Science* **267**, 240-243.

第 7 章　代谢途径合成

代谢途径合成涉及满足某些规定的化学计量关系协调一致的生物化学（酶催化）反应路线的构建。有各种不同的规定，可根据代谢途径中代谢物和生化反应的作用来确定这些规定。一个常见的规定是从指定的一组底物合成一个代谢产物。本书尤其把重点集中在代谢物和生物反应上，因为它们组成代谢途径的基本结构单元。因而，一些代谢物被指定为需要的（required substrates）底物或需要的最终产物（required final products），而大多数其它代谢物被指定为允许的（allowed reactants ）反应物或副产物。类似地，很多生化反应被允许参与一条途径的构建，而在该代谢网络中另一些生化反应则被禁止参与。

导致某一特定产物的所有可能路线的系统列举不仅与代谢途径分析的来龙去脉有关，而且还与生物过程设计的早期阶段有关。第一，在生物过程设计的情况下，如果导致一个所希望的产物的所有可供选择的途径都被识别，那么由不同途径所共享的共同特性就会出现，这在以一个有意义的方式评价各种生物合成选择方案时可能是非常有帮助的。这些共同特性是：由所有不同途径所共享的一个中间代谢物；或者是一个或多个对产物合成所绝对必需的酶；或者是对整个过程的得率至关重要的因素。第二，可以进行各种可选择途径的得率计算，从中可识别具有最适得率的途径。第三，所有可能途径的知识，在更精确地确定某特定酶缺失突变株的表型中是非常重要的。人们还需要确定哪些底物能使突变株生长，哪些底物不能使之生长。由于微生物的生长能力主要取决于与其分解代谢所允许的碳源和氮源相适应的途径的功能，途径列举能够指导阻碍生长的特定酶的消除。第四，通过了解生长限制性底物能被微生物分解代谢，而产物能由微生物形成的各种可能的方法，将会改进我们在发酵实验中解释实验观察结果的方法。

在代谢途径分析和通量确定的前后关系中，途径列举在协调代谢通量分析过程中得到的大量代谢物速率和同位素标记数据方面能够具有极为关键的重要作用。如第 9 章所述的，代谢通量估计必须通过试差过程中的冗余测量来证实确认，该过程也包括途径修饰。在此过程中，明显重要的是：知道如何产生与同位素标记分布相关的所有可能的途径，并选择一条途径，使其能在预计的和测量的速率与标记分布之间给出最好的一致。注意到，除了证实通量估计外，途径列举与同位素标记协调平衡相结合可以是发现新途径的强有力的工具。

一条途径并不是生化反应单纯的集合，因为许多截然不同的途径可能包括相同的生化反应，但却实现不同的转化。例如，反应 $A \rightarrow B + C$ 和 $2B + C \rightarrow D$ 能够形成途径 $2A \rightarrow\rightarrow D + C$，也可以形成途径 $A + B \rightarrow\rightarrow D$，这取决于组合反应时的比例是 2:1 还是 1:1。一条完全确定的途径必须包括一组系数，其中一种系数是对应于包括在该途径中的每个生物反应，表示反应化学计量组分被结合的比例。这些系数中的这一组系数是途径化学计量学（Pathway Stoichiometry），而经此途径以净反应物和净产物的形式所达到的总转化是途径的分子化学计量学（Molecular Stoichiometry of the pathway）。在下一节，将定义专门的符号来反映这些差别，特别是途径化学计量学。

图 7.1 描绘了代谢途径的系统合成的一种直观方法，它反映了一种方法：从一个已给的底物开始，列出所有可能的反应，这些反应能消耗这种已指定的底物。这些反应的每一个生

产产物（B_1，B_2，B_3），又依次变得适用于其它反应利用。这样，底物到产物递归进行，途径因而被构成。对任何正在扩展的途径，其下一轮扩展可利用的底物应包括在途径运行至此已产生的所有产物。由于这种方法相当快地导致组合爆炸（combinatorial explosion），因此必须引入冗余途径消除的方法手段以使由上述方法引起的高度计算复杂性得以部分简化。尽管有限制可能组合的数目的各种方法，但这种方法仍有一些缺点：（1）这种方法在这种意义上是不完善的，如有些途径确实存在，但该方法不能合成；（2）该问题是以一种相当限制性的方法用列出式子的方式进行的，因为它仅包括所需的底物和产物，但没有为所允许的反应物和副产物做好准备；（3）该方法应用于大的生物反应网络时要求以指数增长的计算机时间；（4）该方法只是一种计算机程序，而不是真正的算法。

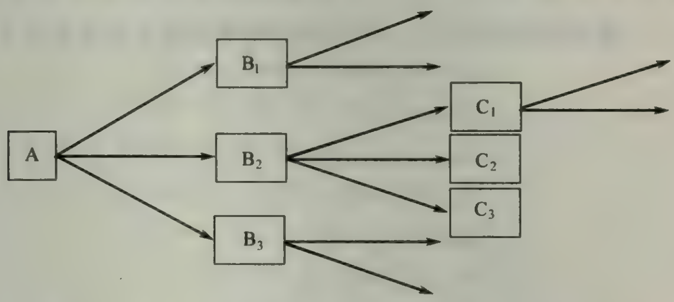


图 7.1　来自指定最初反应物 A 的三条途径扩展计划示意
这种方法的途径列举会导致组合爆炸

本章提出一种生化途径合成的方法，它通过完全不同的体系来克服上述方法所存在的问题。首先通过例子一步步详细地说明算法的应用，然后用一节总结这种代谢途径合成算法的一般特征。最后，介绍一个实例研究来总结这种方法学的内在特征，同时给出从与代谢途径合成类似的练习中能够预见的该类结果实例。

7.1　代谢途径合成算法

依从 Mavrovouniotis 等人（1992 a，b）关于算法基本原理和精确度及完整性证明的大部分讨论的原始参考。这里，在构成如下反应的酶反应数据库中，通过考虑导致从代谢物 A 到代谢物 L 产生的所有可能的生物合成路线中的问题举例来说明这种程序步骤：

(a) $A \rightarrow B$
(b) $B \leftrightarrow C$
(c) $C \leftrightarrow D$
(d) $C + D \leftrightarrow F + K$
(e) $F + K \leftrightarrow H + E$
(f) $H + D \leftrightarrow E + F$
(g) $A \leftrightarrow E$
(h) $E \rightarrow F + G$
(k) $F \leftrightarrow G$
(m) $G \rightarrow L$

除 A 作为所需的反应物、D 作为所需的产物外，所有其它代谢物被指定为排除反应物

(excluded reactants）和排除产物（excluded products)。排除反应物或排除产物都不能参加到代谢途径中，因为这会意味着这样一个反应物必须由外界来提供，或者此产物能够伴随目标代谢物一起形成（见例 7.1 和例 7.2)。

首先建立反应(b)，(c)，(d)，(e)，(f)，(g)和(k)的逆反应。并指定这些逆反应分别为(−b)，(−c)，(−d)，(−e)，(−f)，(−g) 和 (−k)。每一个（正或逆）反应现在都看做一条"一步"分途径（one-step partial pathway)。为了完善此问题初始状态的描述，还分别列出每一个代谢物及其参与的途径。在这里，应用两种符号体系来表示途径。为了仅仅表示构成途径的反应，表达式[如 2a，2(−g)，b]表示一条途径是作为反应(a)、(−g)和(b)的线性组合而构建的，这些反应的系数分别为 2、2 和 1。另外，为了表示由这个途径所完成的总的转化，使用表达式 2E→→B + C。这两种可供选择的表达式可结合成2E→[2a，2(−g)，b]→B+C 。通过使用这种符号，此问题的初始状态必然伴有如下的途径：

A→[a]→B
B→[b]→C
C→[−b]→B
C→[c]→D
D→[−c]→C
C+D→[d]→F+K
F+K→[−d]→C+D
F+K→[e]→H+E
H+E→[−e]→F+K
H+D→[f]→E+F
E+F→[−f]→H+D
A→[g]→E
E→[−g]→A
E→[h]→F+G
F→[k]→G
G→[−k]→F
G→[m]→L

各代谢物分别参与的代谢途径如下：

(A) [a]，[g]，[−g]
(B) [b]，[−b]，[a]
(C) [b]，[−b]，[c]，[−c]，[d]，[−d]
(D) [c]，[−c]，[d]，[−d]，[f]，[−f]
(E) [e]，[−e]，[f]，[−f]，[g]，[−g]，[h]
(F) [d]，[−d]，[e]，[−e]，[f]，[−f]，[h]，[k]，[−k]
(G) [h]，[k]，[−k]，[m]
(H) [e]，[−e]，[f]，[−f]
(K) [d]，[−d]，[e]，[−e]
(L) [m]

遵循该算法，必须先处理参与在较少途径中的代谢物。因此，首先处理仅参与一条途径

的代谢物 L。L 是一个所需要的产物（并且是一个排除反应物）。因为 L 由一个分途径产生而且不会被其它任何分途径所消耗，因此处理这个代谢物的约束不会改变任何途径。下一步处理的代谢物必须是 A 或者 B，这两个代谢物处理的先后顺序不会影响结果，因此可以任意选择 B。一个新的途径被构建：[a，b] 作为 [a] 和 [b] 的组合，此运算过程以符号表示为[a]+[b]=[a,b]。注意，不允许建立途径[b]+[-b]，因为它正、反两个方向包括同一个反应，这样的途径将产生一个无价值的循环，不完成任何转化。组合 [a，b] 构建之后，途径 [a]、[b] 和 [-b] 可从所允许的反应数据库中删除。这就把这组活性途径（active pathway）简化如下：

A→[a,b]→C
C→[c]→D
D→[-c]→C
C+D→[d]→F+K
F+K→[-d]→C+D
F+K→[e]→H+E
H+E→[-e]→F+K
H+D→[f]→E+F
E+F→[-f]→H+D
A→[g]→E
E→[-g]→A
E→[h]→F+G
F→[k]→G
G→[-k]→F
G→[m]→L

更新后仍需进一步处理的这组代谢物变为：

(A) [a,b]，[g]，[-g]
(C) [a,b]，[c]，[-c],[d]，[-d]
(D) [c]，[-c]，[d]，[-d]，[f]，[-f]
(E) [e]，[-e]，[f]，[-f]，[g]，[-g]，[h]
(F) [d]，[-d]，[e]，[-e]，[f]，[-f]，[h]，[k]，[-k]
(G) [h]，[k]，[-k]，[m]
(H) [e]，[-e]，[f]，[-f]
(K) [d]，[-d]，[e]，[-e]

下一步处理代谢物 A。因为 A 是所需要的反应物和排除产物，一个新的组合途径构建为：[-g]+[a,b]=[-g,a,b]，而且仅仅删除了途径 [-g]。对下一步，从代谢物 G，H 和 K 中任意选出 G（因为这三者参与反应的数目都相同）。在处理 G 的过程中，有两条途径 [-k] 和 [m] 消耗它，有两条途径 [h] 和 [k] 产生它。因此，可构建四种组合，除了 [k] 不能和 [-k] 组合之外，可以保留三种合理的组合，即：[h]+[-k]=[h,-k]，[h]+[m]=[h,m]和[k]+[m]=[k,m]。G 参与的原来的四个途径被删除。处理完 A 和 G 之后，活性途径如下：

A→[a,b]→C

C→[c]→D

D→[−c]→C

C+D→[d]→F+K

F+K→[−d]→C+D

F+K→[e]→H+E

H+E→[−e]→F+K

H+D→[f]→E+F

E+F→[−f]→H+D

A→[g]→E

E→[−g,a,b]→C

E→[h,−k]→2F

E→[h,m]→F+L

F→[k,m]→L

更新后仍需进一步处理的这组代谢物变为：

(C) [a,b]，[c]，[−c]，[d]，[−d]，[−g,a,b]

(D) [c]，[−c]，[d]，[−d]，[f]，[−f]

(E) [e]，[−e]，[f]，[−f]，[g]，[−g,a,b]，[h,m]，[h,−k]

(F) [d]，[−d]，[e]，[−e]，[f]，[−f]，[h,m]，[k,m]，[h,−k]

(H) [e]，[−e]，[f]，[−f]

(K) [d]，[−d]，[e]，[−e]

代谢物 K 参与四条途径，下一步对其处理。建立[d]+[e]=[d,e]和[−e]+[−d]=[−e,−d]两种组合，而途径 [d]，[−d]，[e] 和 [−e] 被删除。于是活性途径变为：

A→[a,b]→C

C→[c]→D

D→[−c]→C

C+D→[d,e]→H+E

H+E→[−e,−d]→C+D

H+D→[f]→E+F

E+F→[−f]→H+D

A→[g]→E

E→[−g,a,b]→C

E→[h,−k]→2F

E→[h,m]→F+L

F→[k,m]→L

更新后仍需进一步处理的这组代谢物变为：

(C) [a,b]，[c]，[−c]，[d,e]，[−e,−d]，[−g,a,b]

(D) [c]，[−c]，[d,e]，[−e,−d]，[f]，[−f]

(E) [d,e]，[−e,−d]，[f]，[−f]，[g]，[−g,a,b]，[h,m]，[h,−k]

(F) [f]，[−f]，[h,m]，[k,m]，[h,−k]

(H) [d,e]，[−e,−d]，[f]，[−f]

用类似的方法处理 H，建立如下两个组合途径：[-f]+[-e,-d]=[-f,-e,-d]和[d,e]+[f]=[d,e,f]。需要再一次指出的是，在正、负方向包括相同反应的途径不能被构建。因此新的途径就变为：

A→[a,b]→C

C→[c]→D

D→[-c]→C

C+2D→[d,e,f]→2E+F

2E+F→[-f,-e,-d]→C+2D

A→[g]→E

E→[-g,a,b]→C

E→[h,-k]→2F

E→[h,m]→F+L

F→[k,m]→L

更新后仍需进一步处理的这组代谢物变为：

(C) [a,b], [c], [-c], [d,e,f], [-f,-e,-d], [-g,a,b]

(D) [c], [-c], [d,e,f], [-f,-e,-d]

(E) [d,e,f], [-f,-e,-d], [g], [-g,a,b], [h,m], [h,-k]

(F) [d,e,f], [-f,-e,-d], [h,m], [k,m], [h,-k]

因为代谢产物 D 仅参与四条途径，下面对它进行处理。因为在反应 [d, e, f] 和[-f,-e, -d] 中，代谢物 D 的系数是 2，这一点必须反映在新建立的组合中。新建立的途径为：[2c]+[d,e,f]=[2c,d,e,f]和[-f,-e,-d]+2[-c]=[-f,-e,-d,2(-c)]，而 D 原来所参与的四个途径都被删除。现在该组活性途径变得非常小：

A→[a,b]→C

3C→[2c,d,e,f]→2E+F

2E+F→[-f,-e,-d,2(-c)]→3C

A→[g]→E

E→[-g,a,b]→C

E→[h,-k]→2F

E→[h,m]→F+L

F→[k,m]→L

目前只有三个代谢物仍需处理：

(C) [a,b], [2c,d,e,f], [-f,-e,-d,2(-c)], [-g,a,b]

(E) [2c,d,e,f], [-f,-e,-d,2(-c)], [g], [-g,a,b], [h,m], [h,-k]

(F) [2c,d,e,f], [-f,-e,-d,2(-c)], [h,m], [k,m], [h,-k]

因为代谢物 C 只参与四条途径，因此下一步对它处理且产生两种组合：3[a,b]+[2c,d,e,f]=[3a,3b,2c,d,e,f]和 3[-g,a,b]+[2c,d,e,f]=[3(-g),3a,3b,2c,d,e,f]。删除原来 C 所参与的四条途径后，活性途径变为：

3A→[3a,3b,2c,d,e,f]→2E+F

A→[g]→E

E→[3(-g),3a,3b,2c,d,e,f]→F

E→[h,−k]→2F

E→[h,m]→F+L

F→[k,m]→L

还需处理的两个代谢物是：

(E) [3a,3b,2c,d,e,f], [g], [3(−g),3a,3b,2c,d,e,f], [h,m], [h,−k]

(F) [3a,3b,2c,d,e,f], [3(−g),3a,3b,2c,d,e,f], [h,m], [k,m], [h,−k]

上述这两种代谢物参与的途径个数相等，以任一顺序进行处理都可得到最后结果。首先选择代谢物F，于是得到三种新组合途径：[3a,3b,2c,d,e,f]+[k,m]=[3a,3b,2c,d,e,f,k,m]；[h,m]+[k,m]=[h,k,2m]和[3(−g),3a,3b,2c,d,e,f]+[k,m]=[3(−g),3a,3b,2c,d,e,f,k,m]。代谢物F原来所参与的五条途径被删除，剩余的活性途径是：

3A→[3a,3b,2c,d,e,f,k,m]→2E+L

A→[g]→E

E→[3(−g),3a,3b,2c,d,e,f,k,m]→L

E→[h,k,2m]→2L

剩下没有处理的是代谢物E，参与所有四条路径。E的处理（而且略去在相反方向包含相同反应的途径）导致如下组合：(1/3)[3a,3b,2c,d,e,f,k,m]+(2/3)[3(−g),3a,3b,2c,d,e,f,k,m]=[2(−g),3a,3b,2c,d,e,f,k,m];[3a,3b,2c,d,e,f,k,m]+2[h,k,2m]=[3a,3b,2c,d,e,f,3k,5m,2h]和更简单的[g]+[h,k,2m]=[g ,h,k,2m]。应当注意的是，为了使组合途径获得较小的整数系数，在构建组合时，用了分数1/3和2/3而不是1和2。当所产生的途径除以3时可得同样的效果。

很显然，相乘常数没有影响途径的转化和总结果的实质，仅仅是代谢物和反应物的摩尔比例有关系，因此最后途径是：

A→[2(−g),3a,3b,2c,d,e,f,k,m]→L [P1]

3A→[3a,3b,2c,d,e,f,3k,5m,2h]→5L [P2]

A→[g,h,k,2m]→2L [P3]

这三条途径对于最初合成问题都是可行的解，所有其它途径只是这组途径的线性组合，且用正的系数。途径合成的一些其它方法利用特定的规则以便仅仅产生基本途径，比如，它们应用如下一条规则："如果一种酶需要一种底物，而该底物已被此途径用于那个酶，那么这个底物必须被这个途径中的同一酶系所产生。"该例子表明，这里所介绍的方法，在没有这种类型的附加规则的情况下，能实现基本途径的构建（并且避免了多余途径的建立）。

人们可以观察到，所构建的三条途径中，只有两条是线性独立的：途径［P2］可以由途径[P1]+2[P3]得到。然而，所有这三个途径都是有用的，因为它们在基因型上是独立的，即，它们包含独立的酶系。尽管途径［P2］是途径［P1］和2［P3］的和，但是途径［P2］中酶系不是途径［P1］和［P3］中各自酶系的联合，特别是，酶g在途径［P1］和［P3］中都存在，但不存在于［P2］中。

如果希望基于底物A的产物L的高得率，那么可以看出途径［P3］是三个途径中最好的。因此，除了研究由底物和代谢产物之间存在的不同路线外，途径合成算法对于评估当碳源经不同代谢途径加工时的总得率是很有用的。然而在许多情况下，由这种算法所产生的途径将取决于细胞的生理状态，例如，一些用于生化合成的代谢物的消耗或排泄取决于细胞的生长条件。因此，对于总得率的计算，后面几章所阐述的代谢通量分析通常是更适合的，因

为在进行总得率计算时，有可能对某些途径通量要规定限制条件。

7.2 算法综述

代谢物能以下列三种身份之一参与生化反应途径：（1）作为该途径的净反应物，即该代谢物被净消耗；（2）作为该途径的净产物，即该代谢物被净生成；（3）作为中间代谢物参与，换句话说，没有净消耗或净生成。

此外，可以对在代谢途径构建中所考虑的不同代谢物施加一些约束。它们可以被如下的事实所约束：（i）被指定为所需要的反应物，由此它们一定被这个途径所消耗而且它们的化学计量系数是严格小于零；（ii）被指定作为所允许的反应物，它们可以被该途径所消耗，也可以不被消耗，在这个途径中其化学计量系数是小于或等于零；（iii）被指定为排除反应物（或禁止反应物），其一定不被该途径所消耗。在大多数情况下，只有少数几个反应物被分类为所需要的反应物，而大多数代谢物呈现排除反应物的缺席规则特征。以这种资格，它们在途径中既不被合成，也不被消耗，而且一定要提供一些反应以至于它们变化的净速率等于零。

除了对代谢物约束之外，用户还可以对生物反应施加约束。因此，人们需要规定那些生物反应是以所需要的、所允许的和被禁止的身份参与该途径。这些约束中的一些很容易满足。例如，指定某些反应是排除反应这样的约束能够从开始就完全满足，这可通过从活性数据库中完全删除上述反应即可。人们还应注意反应可从正的或逆的方向进行。指定一些生物反应在这两个方向之一是排除反应这样的约束也可能是存在的。这样的一些约束是从热力学或关于生物反应的不可逆性的机理论据中推导出来的。这些生物反应约束不是独立的。例如，一个在正方向的所需要的生物反应一定在反方向被排除。

本质上，上述所有约束都是化学计量约束。前一节所阐述的算法从根本上说是试图满足施加于生化途径中代谢物参与方面的约束。算法执行的第一步就是收集建立一个所允许的生化反应及其化学计量学的数据库。以这种形式，最初的这组生化反应一般不满足这些约束条件，因为它们需要排除反应物的净消耗，而排除反应又必须不被该途径所消耗。该算法尝试不同约束条件的重复迭代满足，由此，最初一组生化反应以逐步的方式转化为一组途径，它能满足所施加的所有约束。

算法的主体是一次处理一个约束。在每个迭代阶段，途径合成算法的状态由如下两方面所表征：由满足已经被处理的约束条件的一组分途径所表征及由还必须被满足的一组化学计量约束条件所表征。在下一个途径扩展步骤，通过选择剩余的代谢物之一作为目标，再一个约束将被满足。被选为最合适的代谢物是参与在尽可能最少数目的活性途径中的代谢物。代谢物能作为反应物或产物参与这样的途径。根据所说的最合适代谢物的选择，该组活性途径因而被修饰以满足此约束条件。例如，如果此约束指定一个代谢物作为排除反应物或排除产物，则所有可能的组合途径必须通过结合一条途径消耗此代谢物和一条途径生产该代谢物而被构建，以至于该代谢物从总的化学计量关系中被消除。一旦这个组合被构建成，所有消耗或合成这个代谢物的途径都被删除，因为它们违背约束的要求：该代谢物在途径中没有净消耗或净合成。如果这个代谢物除了是一个所需要的产物以外，还是一个排除反应物，那么同样的组合途径可被构建。然而在这种情况下，只是删除消耗这个代谢物的途径。

这些约束的线性性质有一个重要的影响。一旦一个限制被所有依然存在的途径满足，则这些途径的进一步线性组合也将决不违背这一约束。因此，每个约束处理之后，则新的活性

途径会满足所有先前处理过的约束。

途径合成算法应用需要是一个可能的酶反应数据库。具有 250 个酶反应和 400 种代谢物的这样一个数据库已由 Maurovouniotis（1989）建成。下面用这个数据库［见 Maurovouniotis et al，（1992a，b）］所产生的一些例子（例 7.1、例 7.2）说明该算法的应用。

【例 7.1】 丝氨酸的合成

利用下面的规定，途径合成问题定义如下：在能导致丝氨酸（所需要的产物）合成的单一酶反应数据库范围内列举所有可能途径，以葡萄糖作为所需要的反应物，以 NH_3 为所允许的反应物，以 CO_2 为所允许的产物。此外，还引入如下所允许的代谢物：氧化-还原流通代谢物（NAD，NADH，NADP，NADPH，FAD 和 $FADH_2$），直接能量流通代谢物（ATP，ADP，AMP），间接能量流通代谢物（GTP，GDP，GMP，TTP，TDP，TMP，UTP，UDP，UMP，CTP，CDP 和 CMP）以及一些其它物质［辅酶 A、磷酸（P_i）和焦磷酸（PP_i）］等。

用这个系统，算法滞留在处理关于给乙酰辅酶 A 和苹果酸代谢物约束条件的步骤中，这是代谢物在丝氨酸合成途径中非常重要的证据。为此原因，它们被明确规定为所允许的代谢物，这意味着如果它们出现在总的丝氨酸生物合成途径中，则为它们的产生的附加途径也必须被包括在内。通过添加这些途径，这个算法运行到完成。它产生了 1526 个途径，其中最长的途径包含有 26 个反应。其中一些途径将讨论如下。

图 7.2 所示为丝氨酸生物合成的正常途径。葡萄糖首先通过糖酵解分解为 3-磷酸甘油酸（3-PG），其经 3-磷酸羟基丙酮酸和 3-磷酸丝氨酸转化为丝氨酸，提供丝氨酸合成所需的氮的谷氨酸由谷氨酸脱氢酶提供。

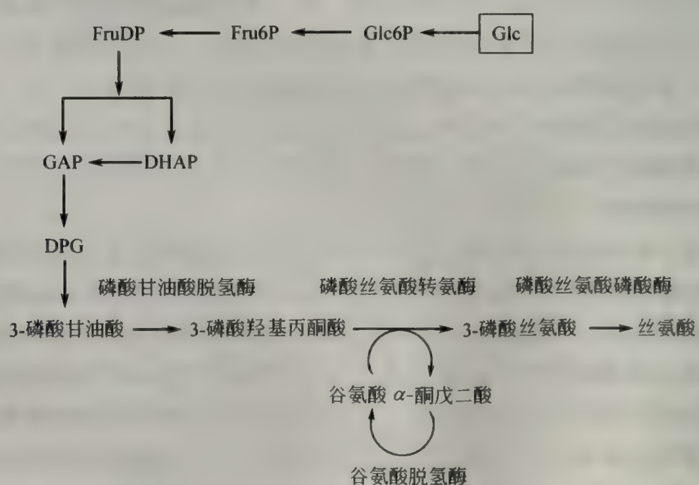


图 7.2 由葡萄糖合成丝氨酸的途径

伴随着谷氨酸通过谷氨酸脱氢酶的回收

缩写：Fru6P—6-磷酸果糖；FruDP—1,6-二磷酸果糖；DPG—1,3 二磷酸甘油醛

图 7.3 所示为丝氨酸合成的一条替代途径，其与图 7.2 类似，但有如下不同：谷氨酸的再生不是通过谷氨酸脱氢酶而是通过包括延胡索酸，天冬氨酸，草酰乙酸和苹果酸等中间物的一组反应。对于从 α-酮戊二酸和氨转化为谷氨酸这种特殊的选择只是许多可能性之一。

另一个类似的可能性是众所周知的路线：通过谷氨酰胺，用由谷氨酰胺合成酶和谷氨酰胺合酶所催化的反应。

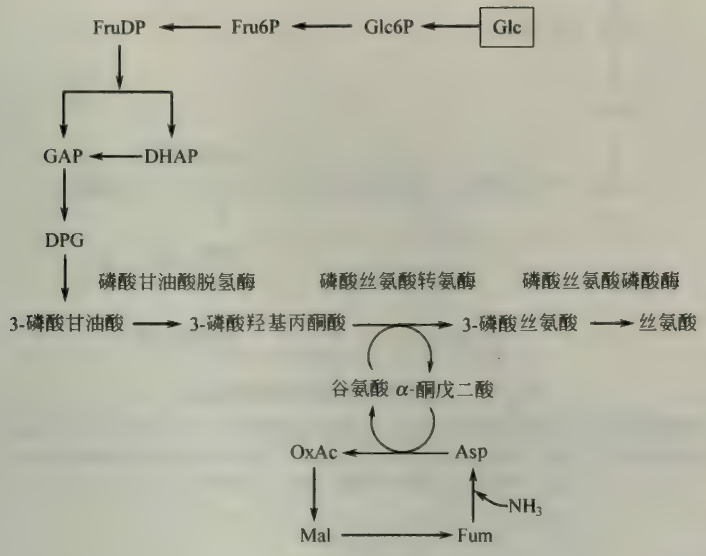


图 7.3　由葡萄糖合成丝氨酸

伴随着谷氨酸的回收，并且经由一个包括延胡索酸（Fum）、天冬氨酸（Asp）、草酰乙酸（OxAc）和苹果酸（Mal）的回路

这样，该算法规定谷氨酸回收的不同路线，而且这清楚地说明细胞代谢的复杂性。在生物化学教科书中人们可能形成印象，认为书中所列出的途径即为细胞内运行的途径。然而，一些物质（像谷氨酸），当作为一些关键化合物出现时，对其回收可能会有几种不同的路线，而且其中几条可以平行运行。这可由该算法产生的不同途径来举例说明。在下面几章关于代谢通量的分析中，将研究这些不同途径中的相对贡献如何能被量化。

【例 7.2】　丙氨酸合成

在丙氨酸合成的情况下，最初的系统是规定葡萄糖为所需要的反应物，丙氨酸为所需要的产物，NH_3 和 CO_2 分别为所允许的反应物及产物。与丝氨酸一样，苹果酸和乙酰辅酶 A 被分别指定为所允许的反应物及产物。图 7.4 所示为以葡萄糖为主反应物对于丙氨酸合成的通常途径应当考虑的问题。如前所述，葡萄糖由糖酵解途径分解代谢为丙酮酸，其进而由丙氨酸氨基转移酶转化为丙氨酸。该反应所需要的谷氨酸是经谷氨酸脱氢酶从 α-酮戊二酸所回收。

可供选择的替代途径可通过结合谷氨酸回收的不同方法类似地产生，例如图 7.3 所示的合成丝氨酸的包括延胡索酸、天冬氨酸、草酸乙酸及苹果酸的回路等。还有，另一个途径能将丙酮酸不是通过丙氨酸氨基转移酶转化为丙氨酸（Ala），而是经丙氨酸脱氢酶。因为后一个反应可直接利用氨，而对于 α-酮戊二酸到谷氨酸的转化，不必利用谷氨酸脱氢酶或任何其它系统。

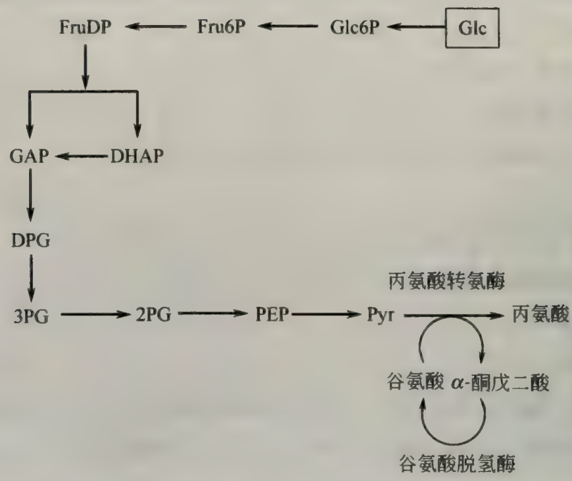


图 7.4 由葡萄糖合成丙氨酸的途径

伴随谷氨酸经谷氨酸脱氢酶的回收。谷氨酸也能被图 7.3 所示替代途径所回收。
通过丙氨酸脱氢酶，氨可直接整合进入丙氨酸，而绕开所有的谷氨酸回收反应
缩写：3PG—3-磷酸甘油酸；2PG—2-磷酸甘油酸

7.3 实例研究——赖氨酸生物合成

本节介绍从葡萄糖和氨合成赖氨酸的实例研究，以便证明示范从途径合成算法的应用所能得到的不同类型的结果。应当注意的是，这里的目的不是提供所有可能途径的完全列举，因为这能很容易地数出几百条。目的是举例说明一般可接受的途径的构建并探索关于“关键酶和代谢物的参与”的替代选择。这种过程能导致关于赖氨酸生产途径的结构和得率的一些基本限制。

应注意，所建立的这组途径仅仅相对于所使用的生物反应数据库才是完整的。当附加的生物反应引入该数据库中时，则该搜索的结果就变得不完整了，但是，先前已构建的途径仍然是有效的。另外，如果所建途径的数目是不可抵挡的大，则可以考虑酶反应数据库的适当减小以便减少所产生的途径数目。

通过使用与丝氨酸和赖氨酸合成一样的数据库，该算法产生了大约 500 条不同的途径。为简化此实例研究，假定 α-酮戊二酸脱氢酶是不起作用的，从而从数据库中排除。除了简化这些结果外，这个实例还说明在缺失上述酶的突变株中赖氨酸生产需要什么条件。图 7.5 显示了所得的途径，从中可以看出，为了补充 TCA 循环和弥补 α-酮戊二酸脱氢酶活性的缺失，利用了乙醛酸旁路。整个途径包括的基本单元有糖酵解、TCA 循环、从草酰乙酸到天冬氨酸的途径以及天冬氨酸与赖氨酸之间的一系列反应。

途径合成算法的应用之一是：如果一个反应已被证明构成了整个途径的一个瓶颈，探索绕过这样一个单个反应的可能性。例如，如果我们假定苹果酸脱氢酶是这个途径的一个关键限制酶，因此希望产生一些替代途径绕过这个酶。图 7.6(a)显示了一条这样的途径，其排除了苹果酸脱氢酶。事实上，该途径绕开了整个 TCA 循环，它是通过由丙酮酸直接羧化成草酰乙酸而进行的，这个反应可由丙酮酸羧化酶或草酰乙酸脱羧酶催化完成。该途径也产生一个更具吸引力的摩尔得率。如果忽略来自氧化还原和 ATP 平衡的限制，图 7.6(a)中这条

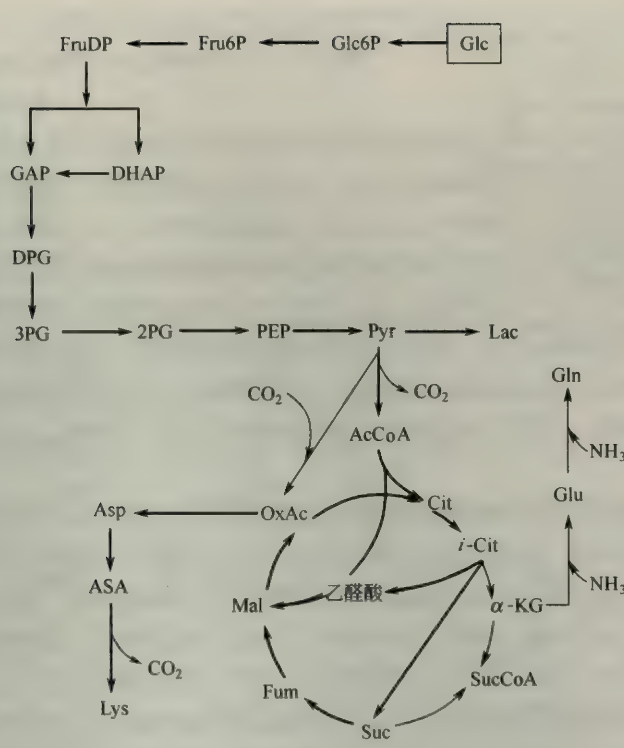


图 7.5　从葡萄糖合成赖氨酸的一种可能的生物反应网络

粗体箭头指的是 α-酮戊二酸脱氢酶缺失而经乙醛酸旁路的赖氨酸合成途径。
另一种可能性包括磷酸烯醇丙酮酸和丙酮酸羧化作用的回补反应。
此途径仅考虑碳骨架的形成，不包括能量和氧化还原代谢物的再生
缩写：Cit—柠檬酸；i-Cit—异柠檬酸；SucCoA—琥珀酰辅酶 A；
Suc—琥珀酸；ASA—天冬氨酸-β-半醛；Lys—赖氨酸；α-KG—α-酮戊二酸

途径的最高得率是 100%（以摩尔为基准），与图 7.5 所示途径相比，那条途径的摩尔得率仅为 67%。

如果人们宁愿仅仅在紧临一个限制反应之处绕开而保留原途径的大部分结构（包括 TCA 循环），则可以探索较小的扰动。这样一个替代途径由仅有两个反应的一组反应就可绕开苹果酸脱氢酶将苹果酸转化为草酸乙酸。其一是：

$$苹果酸 + 丙酮酸 \rightarrow 草酰乙酸 + 乳酸$$

该反应由乳酸-苹果酸转氢酶催化。另一个是：

$$乳酸 \rightarrow 丙酮酸$$

该反应是由乳酸脱氢酶逆向催化。

另一条替代途径如图 7.6(b)所示，它包括由延胡索酸酶在与图 7.6(a)相反的方向将苹果酸转化为延胡索酸，及由琥珀酸脱氢酶像在原始途径一样将琥珀酸转化为延胡索酸。此外，延胡索酸通过天冬氨酸裂解酶转化为天冬氨酸。因为草酰乙酸被利用以便形成柠檬酸，一半天冬氨酸必须循环进入草酰乙酸以闭合 TCA 循环。在图 7.6(b)的途径中，天冬氨酸-谷氨酸转氨酶转化天冬氨酸到草酰乙酸的反应是通过与原始生化反应网络（图 7.5）中该反应的相反方向来运行的。如果应用从天冬氨酸转化为草酰乙酸的这组反应（含两个反应），图7.6(b)所示的先前的途径会产生一个小改变(见图7.7)。首先，由甘氨酸(Gly)-草酰

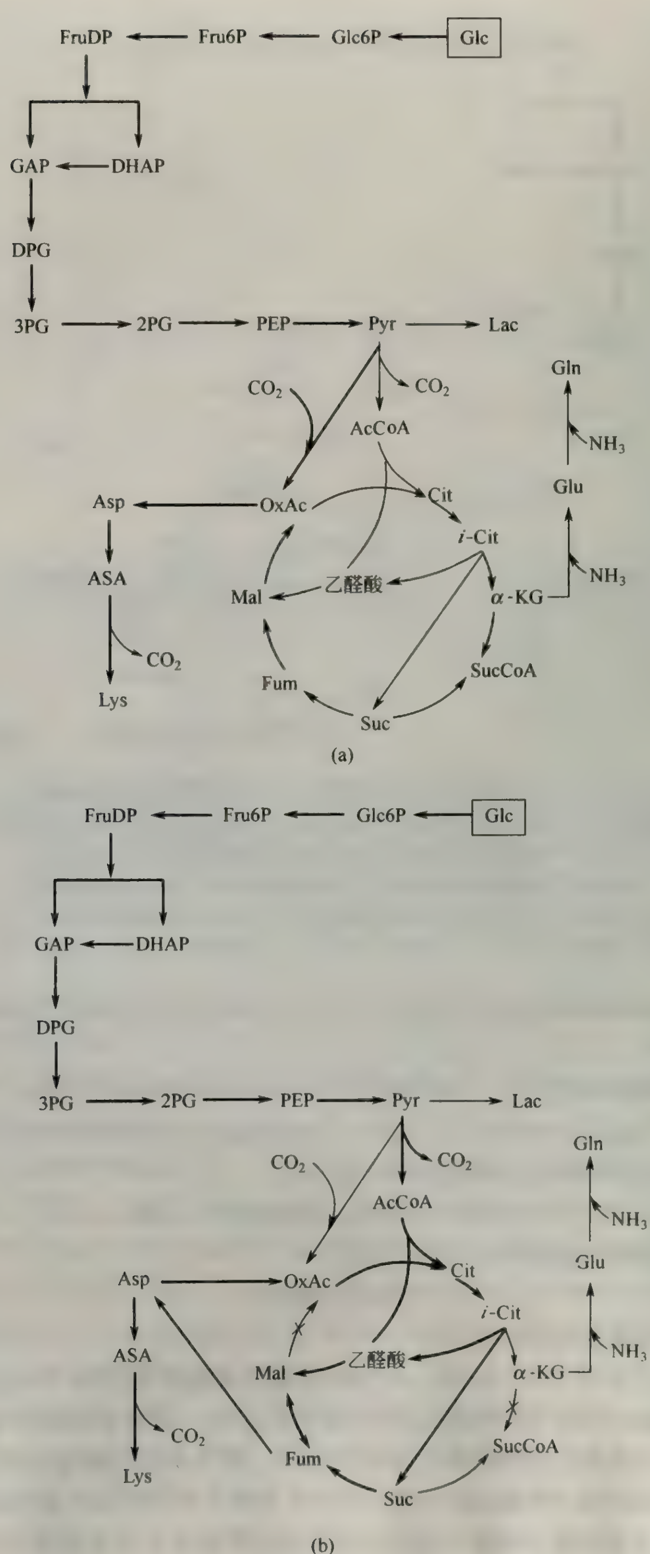


图 7.6 赖氨酸合成的替代途径

绕开了苹果酸脱氢酶，该酶催化苹果酸转化为草酸乙酸

乙酸氨基转移酶转化乙醛酸和天冬氨酸成为甘氨酸和草酰乙酸，然后，甘氨酸脱氢酶将甘氨酸循环进入乙醛酸。



图 7.7 天冬氨酸转化为草酸乙酸的替代途径

7.3.1 草酰乙酸的作用

从上述几种途径中可以观察到，草酰乙酸在所有这些途径中是一个关键的代谢物。虽然草酸乙酸在图 7.6(b)的途径中是被部分旁流的，但是，一个关键问题是，是否这个代谢物能被完全旁流，并且是否能够构建由丙酮酸或葡萄糖生产赖氨酸的途径，而在任何一处都没有牵连草酰乙酸。根据所产生的全部途径的检验证明，在所使用的酶反应数据库内，这种情况是不可能的。而且，在它存在于所有途径这种意义上讲，没有安置单个反应环绕草酰乙酸。消耗和产生草酰乙酸的那些特定反应可以改变，然而，该中间物本身是始终存在的。因此，草酰乙酸是赖氨酸生产的一个关键节点。

在图 7.6(b)的途径中，天冬氨酸和赖氨酸不是直接起源于草酰乙酸，因为延胡索酸用一个单一酶转化为天冬氨酸。事实上，天冬氨酸转化为草酰乙酸，而不是相反。因此，在这种情况下，在天冬氨酸、延胡索酸、苹果酸和草酰乙酸附近的代谢与人们通常发现的是相当不同的，这部分代谢建议：没有草酰乙酸的介入也有可能获得天冬氨酸。然而，事实证明没有草酰乙酸的介入，不能从葡萄糖生产 TCA 循环所必需的中间物（苹果酸或琥珀酸）。这个限制使得导致从葡萄糖合成赖氨酸的任何途径都必须有草酰乙酸的存在。

为了进一步说明这一点，假设除了葡萄糖之外还可用琥珀酸作为所允许的反应物，根据经验的生物合成分类仍然要求草酰乙酸作为一个所需要的中间物。然而，检验图 7.6(b)中的途径表明，琥珀酸能够转化到延胡索酸，而且从那时起在没有苹果酸或草酰乙酸介入的情况下，由天冬氨酸裂解酶催化生成天冬氨酸。因此，用琥珀酸作为另一种所允许的底物，用一条不需要草酰乙酸的途径完全有可能合成赖氨酸。

7.3.2 其它替代途径

到目前为止，所检验的赖氨酸合成途径或者以丙酮酸脱氢酶或者以丙酮酸羧化酶作为天冬氨酸形成的关键反应，但是，也存在着绕开这两种酶的其它途径，指向其它方法，通过该方法丙酮酸能进入柠檬酸循环。丙酮酸的另一条羧化途径可通过甲基丙二醛辅酶 A 羧基转移酶和丙酰辅酶 A 羧化酶完成，如图 7.8 所示。当然，还有另一种可能性是磷酸烯醇丙酮酸的直接羧化，使糖酵解和 TCA 循环间通过一条完全旁流丙酮酸的路线相连接。

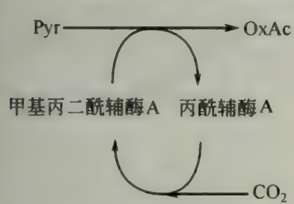


图 7.8 丙酮酸羧化作用的替代途径

由合成算法所产生的所有可能的替代途径当中，仅仅对其中最简单的一些作了介绍。然而，应当记住该算法可以找出所有途径而且其中一些是非常复杂的。作为一个例子，考虑了从磷酸烯醇丙酮酸到丙酮酸的转化这样一个简单任务（该过程可通过丙酮酸激酶在一个单一步骤中完成）。该算法对这个转化产生了几条途径，其中最长的如图 7.9 所示。

7.3.3 关于最高得率的限制

途径合成算法最有趣的应用之一在于理论假说研究。例如，前面已经提到，如果没有包括草酰乙酸作为中间代谢物的话，没有发现由葡萄糖合成赖氨酸的途径。该算法还揭示只有通过羧化反应固定二氧化碳，这个途径的最高得率可以超过 67%。当然，如果羧化反应被

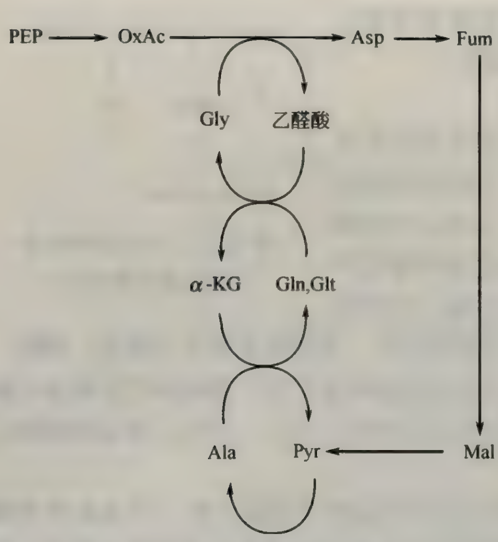


图 7.9　转化磷酸烯醇丙酮酸为丙酮酸的最长的可能途径

消除，则得率被限制在 67%或更少。没有系统的列举所有可能的途径，人们就不能确保不存在其它途径能以更高的得率生产这种产物。例如，如果设计一条途径将 2mol 丙酮酸转化为 3mol 乙酰辅酶 A（没有二氧化碳的消耗或产生），

$$\underset{(\text{丙酮酸})}{2CH_3COCOO^-} + \underset{(\text{辅酶 A})}{3HS\text{-}CoA} + 4H^+ + 2NADH$$

$$\longrightarrow \underset{(\text{乙酰辅酶 A})}{3CH_3CO\text{-}S\text{-}CoA} + 3H_2O + 2NAD^+$$

则基于葡萄糖的赖氨酸得率高于 67%会是可能的。考虑到丙酮酸和草酰乙酸都参与大量的酶反应，根据先前的经验并不明显知道这种途径的存在能被排除。合成算法表明在一个合理完整的数据库内，不存在这种途径。需再一次注意到，所获得的最高得率仅相对于碳的消耗量。当能量和还原当量平衡也被包含在计算中时，这种得率可能还要进一步减小。正如第 9 章～第 11 章中所阐述的。

7.4　算法的讨论

这一章所介绍的途径合成算法是非常有效的，而且能在最短的时间内处理大量化学计量约束限制。最坏的情况是其复杂性与反应的数目成指数关系。但是，这种情形只在一些非常特殊的情况下才发生，如图 7.10 所示的情况。对于每一个菱形编号为 D_1，D_2 等，一条途径可沿上面的分支也可沿下面的分支前进。如果有 N 个菱形，则有 $N-1$ 个交叉汇合点，在此处需要选择如何走。因此，有 $2N-1$ 个不同的途径，它们在基因型上都是独立的。

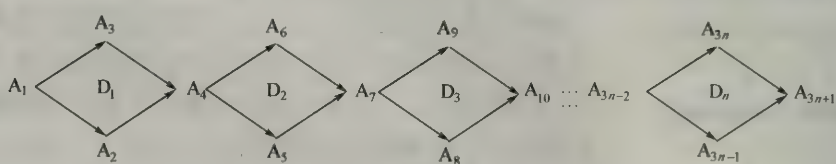


图 7.10　途径数呈指数增长的反应组

在这种情形下，因为算法将构建所有在基因型上独立的途径，因此，途径建立时所需时间与储存量将随反应数而呈指数增长。然而，这只是最坏的设想。实际上，代谢约束限制长的序列反应而不是如图 7.10 所示的平行分支类型的反应。这种长的反应序列用已介绍的方法可以非常有效地被处理，并可导致所有替代选择途径的很快产生。此算法的一个特征是：它的效率方面的贡献是它不必从作为所需要的反应物的代谢物开始（如图 7.1 所示会是这种情况），而是从那些参与最容易满足的约束代谢物开始，即：参与最小反应数目途径的那些代谢物。这种特性，使人想起渴望的算法，大大有助于通过所有可能解产生的反应空间的搜索。

所介绍的方法论的另一个优点是：在代谢物-处理阶段，代谢物是基于它们参加的反应

数目而被选择的。通过这种方法，它们从约束限制中被消除而问题的规模大小被连续减小。如果这些代谢物参与很长的反应序列，那么这些反应序列仅只需考虑一次，因此对于存储及计算资源并不是一个特别的负担。

最后一点涉及共同流通代谢物的处理。这些代谢物必须被定为所允许的代谢物，否则算法将运算很长的时间以为了满足所有的化学计量约束。比如，考虑包括在吉布斯自由能（P_i、ATP 和 ADP）使用中的流通代谢物和两类子途径：这些代谢物充当无效循环将 ATP 转化为 ADP 和 P_i 的作用，这些代谢物完成由特定合成问题所规定的转化，除非这些途径也产生 ATP 和消耗 ADP 和 P_i。如果 ATP 和 ADP 是所允许的反应物和所允许的产物，来自第二类的途径是可接受的解并且它们不要进一步被扩展。然而，如果 ATP 和 ADP 从出现在净化学计量式中被消除，则二类途径必须组合以形成可接受的解。换句话说，来自第二类的一条途径必须与来自第一类的途径组合以便从化学计量式中消除 ATP 和 ADP。所产生的组合数目是非常大的，这就导致严重的执行问题。因此建议把共同流通代谢物包括在所允许的反应物和产物之中。

参 考 文 献

Mavrovouniotis, M. L.(1989). Computer-aided design of biochemical pathways. Ph. D. Thesis, MIT, Cambridge, MA.

Mavrovouniotis, M. L., Stephanopoulos, G. & Stephanopoulos, G.(1992a). Computer-aided synthesis of biochemical pathways. *Biotechnology and Bioengineering* **36**, 1119-1132.

Mavrovouniotis, M. L., Stephanopoulos, G & Stephanopoulos, G.(1992b). Synthesis of biochemical production routes. *Computers and Chemical Engineering* **16**, 605-619.

第 8 章　代谢通量分析

在第 1 章中论述了代谢通量构成细胞生理学的基本决定因素，主要因为代谢通量提供了在整体细胞功能和代谢过程中，各种途径参与程度的度量标准。因此，体内途径通量大小的精确量化是细胞生理学和代谢工程学中的一个重要目标，尤其是从代谢生产的角度看，总是希望尽可能地将底物转化成有用产物。代谢通量分析(MFA)是代谢途径通量确定的一个强有力的方法，因此，通过利用主要胞内反应的化学计量模型及应用围绕代谢物的质量平衡关系，就可计算出胞内通量。一组已测量的胞外通量被用作计算的输入，通常是底物的吸收速率和代谢物的分泌速率。通量计算的最后结果是一幅代谢通量图，图中显示通量计算中所包括的生化反应及稳态速率(即通量)的估计值，图中的每个反应就发生在该稳定状态。图 8.1 对此作了举例说明，其描绘了酿酒酵母(*S. cerevisiae*)在厌氧培养期间通过分解代谢途径的通量分布情况。所有通量是由胞内代谢物物料平衡和细胞与环境之间交换的化合物通量的测量经计算得到的。图 8.1 所示的这种类型的代谢通量图中，含有不同途径对底物利用和产物形成的整个代谢过程所做的贡献这种十分有用的信息。然而，这种代谢通量图的真正价值在于所观测到的通量差别：即当用不同菌种或在不同条件下所得到的代谢通量图进行互相比较所得的通量差别。正是通过这种比较，遗传和环境扰动的影响才能充分予以评价，而且在这样的途径内的特定途径及反应的重要性才能被准确地描述。

除了途径通量量化外，代谢通量分析能够提供关于其它重要的细胞生理特征方面附加的洞察力。这里提供此类附加信息的概括说明，这类信息可以从 MFA 及本书参考文献部分得到，参考文献中对其应用有更详细的说明。

(1) 细胞途径中分支点控制（节点的刚性）的识别。通过比较由不同操作条件的变化及用不同变异株所导致的分支点通量分配比的变化，分支点的柔性或刚性就可被评估(Stephanopoulos and Vallino，1991)。一般来说，刚性分支点抵抗通量分配比的变化，而柔性分支点倾向于更适应通量分配比的变化。代谢网络这些特征方面的知识在合理地解释通量变化的类型中是重要的，而这些变化对改变产物得率是最有效的。在 5.4 节已定义了节点刚性的概念，在 10.1.3 节将举例说明如何利用它来研究氨基酸生物合成。

(2) 替代途径的识别。生物反应化学计量式的列出(其是 MFA 的基础)，需要由底物转化为产物的实际的生化反应路线的详细知识。然而，这对许多微生物来说可能不是很清楚的，因为已在不同生物体中识别出几条替代途径并且知道是在不同条件下运行。在此，重要的是重复途径的定义(见第 1 章)为：连接一组输入代谢物与一组输出代谢物的可行的及可观察的反应序列。MFA 在识别途径中是重要的：其能同样好地重复产生胞外代谢物的宏观通量测量，在这方面，其能消除由于不能满足物料平衡而是不可能的替代途径。Aiba 和 Matsuoka(1979)在柠檬酸发酵中证明了第一个这类方法的应用(见例 8.3)，在 10.1 节，提供了应用 MFA 识别 *C.glutamicum* 中转氢酶活性的例子。

(3) 未测量的胞外通量的计算。有时，能被测量的胞外通量数目小于计算未知胞内通量所需的数目。在这种情况下，通过利用先前实验所确定的通量分配比，有可能计算胞外未测量通量，例如，各种副产物的生产速率，这可通过利用化学计量模型和已测量的通量来计

算。如果这些通量的测量是变得可以利用的，那么它们与模型预测的一致性程度可用于模型证实或修正，可以作为实例(见 8.1.2 节关于超定系统的讨论)。

(4) 最大理论得率的计算。计算理论得率是基于从一个指定的底物生产最多的产物，以构成代谢网络的化学计量式。通量分配比以生成产物量最大来确定。此外，必须关注代谢中间物和流通代谢物之间的关系。当然，有可能确定特定条件下的理论得率，然而，在复杂的代谢网络中，以 MFA 为基础的更为正规的方法是更可取的。理论得率的计算为实际过程提供了一个基准，而且对于已给的应用也能识别具有特别吸引力的替代途径。此外，它们提供了在最高得率的条件下代谢活性的一个有用的标记(即呼吸商)，而最高得率是在寻求最优控制策略时所追求的。这些方法的例子将在 10.1 节给出。

在本章，将介绍代谢通量分析理论并阐述类似于得到图 8.1 所示结果的计算基础。MFA 的一个独特方面是：胞内代谢通量的化学计量确定既可基于相同数目的代谢物平衡式，也可以基于大于或等于这些代谢物的平衡式，这取决于可利用的测量的数目。在第一种情况下没有冗余度，而具有更多的测量则可使过程的真实性得到严格地评估。如果较少的测量是可以

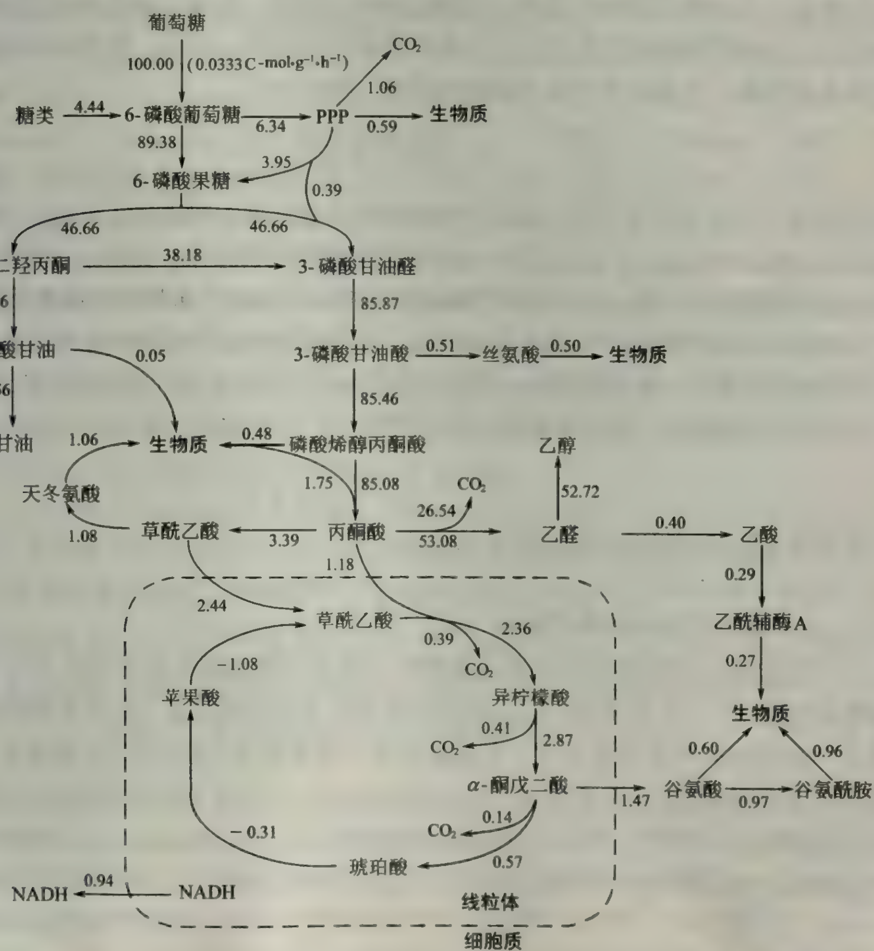


图 8.1　*S. cerevisiae* 厌氧生长时不同代谢途径上的通量

这些通量是利用 Nissen 等(1997)的化学计量模型和一些测量值通过计算得到的，测量值包括葡萄糖和氨的吸收速率，二氧化碳、乙酸、乙醇、甘油、丙酮酸和琥珀酸的产生速率，以及重要大分子库如 DNA、RNA、蛋白质、脂类和糖类的合成速率

利用的，优化约束可以引入，以提供平衡方程完全闭合。这些方面将在8.2～8.4节讨论。在下一章，将讨论利用同位素标记的底物进行代谢通量实验确定的方法，而在第10章，用来自微生物和细胞培养实例研究中的具体例子示范证明MFA的应用。

8.1 理论

MFA的起点是描述底物如何转化为代谢产物和生物质组成(或大分子库)的反应网络化学计量学。利用第3章的框架，考虑经由 K 个途径代谢物进行的 J 个胞内反应，其质量平衡式已由式(3.19)给出，或以向量符号表示为：

$$\frac{d\mathbf{X}_{met}}{dt}=\mathbf{r}_{met}-\mu\mathbf{X}_{met} \tag{8.1}$$

在式(8.1)中，$\mathbf{X}_{met}$是胞内代谢物(或途径中间物）的浓度向量，$\mathbf{r}_{met}$是一个包含在 J 个反应中的胞内代谢物形成净速率的向量。

普遍承认，大多数代谢物库有着非常高的周转。因此，甚至在细胞所经历的环境受到强烈扰动之后，不同代谢物库的浓度也会迅速调整到新的水平。因此，假定途径代谢物处于拟稳定状态是合理的。这意味着没有代谢物的积累，即：

$$0=\mathbf{r}_{met}-\mu\mathbf{X}_{met} \tag{8.2}$$

式(8.2)右边第一项表示 J 个反应中途径中间物的净合成速率，即流进和流出一条途径的代谢物通量的和。第二项表示由于生物质生长而对代谢物库的稀释作用。如果这种稀释效果被认为是一种人为的消耗反应，那么式(8.2)表明流进和流出一个途径代谢物库的通量是相互匹配的，即围绕一个已给途径代谢物库的通量是守恒的。因为大部分途径代谢物的胞内水平是非常低的，所以这种稀释影响一般是很小的，特别是与影响同一个代谢物的其它通量相比较时情况更是这样。因此，上式最后一项一般可被忽略(见例8.1)。于是得到更简单的平衡式：

$$0=\mathbf{r}_{met}=\mathbf{G}^{T}\mathbf{v} \tag{8.3}$$

其中已代入用于代谢物合成净速率的式（3.12)。

【例8.1】 途径代谢物的稀释影响

为了说明式(8.2)中的稀释项是可以忽略的，考虑三种不同类型的胞内化合物：(1）糖酵解途径的中间物；(2）氨基酸；(3）ATP。在表8.1中收集了这三组化合物的相关数据。

在 *S. cerevisiae* 的好氧生长中，在连续培养（稀释速率为0.1 h^{-1}）条件下，已测得糖酵解途径中的代谢物胞内水平是在0.05～1.0μmol·g^{-1}(干重)的范围(Theobald et al, 1997)。在这些生长条件下，通过EMP途径的通量大约为1.1mmol·g^{-1}(干重)·h^{-1}，因此可以看出通过一个代谢物库的通量大大高于式(8.2)中的稀释项，该稀释项值约为0.005～0.1μmol·g^{-1}(干重)·h^{-1}。因此，即使对于较低的糖酵解通量，稀释项也可以是忽略的。对于哺乳动物细胞，胞内代谢物库的水平是大约相同的，但通量是比较小的，在周转率和稀释率之间的差别就比较小，但一般说来，也会得到类似的结果。

在产黄青霉（*P. chrysogenum*）中，胞内氨基酸浓度是在1～45μmol·g^{-1}(干重）的范围。通过氨基酸库的通量取决于蛋白质的合成速率，其在稳定状态下，可从细胞的蛋白质含

表 8.1　不同代谢物的典型胞内水平

化合物	质量摩尔浓度 $\mu mol \cdot g^{-1}$（干重）	代谢路线	微生物	参考文献
6-磷酸葡萄糖	0.90	分解代谢（EMP）	*S. cerevisiae*	Theobald et al (1997)①
6-磷酸果糖	0.20			
1,6-二磷酸果糖	0.10			
3-磷酸甘油醛	0.065			
磷酸烯醇丙酮酸	0.052			
丙氨酸	22.8	合成代谢	*P. chrysogenum*	Nielsen (1997)②
谷氨酸	44.5			
赖氨酸	3.9			
苯丙氨酸	0.9			
ATP	8.0	能量代谢	*S. cerevisiae*	Theobald et al (1997)①

① 数据取自 *S. cerevisiae* 的稳态连续好氧生长($D=0.1h^{-1}$)。

② 数据取自比生长速率较高(即，约 $0.1h^{-1}$)补料-间歇培养的初始阶段。没有发现游离氨基酸库的浓度随环境条件的改变而大幅度变化。

量和比生长速率来确定。对于一个45%(质量比)的典型的蛋白质含量，比生长速率$0.1h^{-1}$，蛋白质合成速率为0.045g(蛋白)$\cdot g^{-1}$(干重)$\cdot h^{-1}$。对于 *P.chrysogenum* 中蛋白质库的氨基酸组成，其平均摩尔质量为112 g/mol(蛋白质结合氨基酸)，因此，为合成蛋白质而消耗氨基酸的速率为0.4 mmol(0.045/0.112，蛋白质结合氨基酸)$\cdot g^{-1}$(干重)$\cdot h^{-1}$(Nielsen，1997)。对于丙氨酸、谷氨酸、赖氨酸和苯丙氨酸的含量（基于摩尔基准）分别为6.6%、12.8%、5.3%和3.7%的情况，通过上述四种氨基酸库的通量分别为26.4$\mu mol \cdot g^{-1}$(干重)$\cdot h^{-1}$，51.2$\mu mol \cdot g^{-1}$(干重)$\cdot h^{-1}$，21.2$\mu mol \cdot g^{-1}$(干重)$\cdot h^{-1}$和14.8$\mu mol \cdot g^{-1}$(干重)$\cdot h^{-1}$。由此可以看出，对少数几个氨基酸，其游离库是很大的，例如丙氨酸和谷氨酸，稀释项比通过游离氨基酸库的通量小10倍的数量级。对这些氨基酸忽略稀释项在计算上可能引起小的误差，但是，如果对于库的大小的数据是可以利用的，则有可能计及稀释项，这可通过包括作为一个人为消耗反应的稀释项来进行［参见 Reardon et al(1987)］。对于游离库很小的氨基酸(大多数氨基酸是这种情况)，稀释项也可以忽略，因为其比通过库的通量小50倍左右。

在 *S. cerevisiae* 中的 ATP 库大约是 8.0 $\mu mol \cdot g^{-1}$(干重)。由于 ATP 参与很多反应，因此难以估计通过库的通量。然而，从 ATP 得率 Y_{xATP}和比生长速率，人们可以得到细胞生长的 ATP 总需要量的估计。如果取 Y_{xATP}为 70 mmol(ATP)$\cdot g^{-1}$(干重)(见例3.4)，可以求出在比生长速率为$0.1h^{-1}$时所需的 ATP 是 7.0 mmol$\cdot g^{-1}$(干重)$\cdot h^{-1}$。因此，通过 ATP 库的通量比稀释项高10000倍，很显然在 ATP 平衡计算中稀释项可以忽略。即使对于具有较高 ATP 库的细胞，例如乳酸菌，这个结论仍然成立。对 NADH 和 NADPH 等其它辅助因子也能得到类似的结论。

从前面的分析可以看出，对于代谢物和辅助因子，因为它们的胞内库具有非常高的周转，故可忽略稀释项。这可以特征时间的形式来表示(见2.1节)。因此，如果代表一个库周转的特征时间(其等于库的大小与通过库的通量之比）大大小于代表生长的特征时间(其等于比生长速率的倒数)，则稀释项可以忽略。

拟稳态假设的一个推论是只需考虑位于代谢反应网络分支点的代谢物。在线性反应序列中的所有途径中间物都可以消除。这可以通过 EMP 途径中的6-磷酸果糖转化为磷酸二羟丙酮和3-磷酸甘油醛的过程来说明。这个转化过程包括两步反应，它们的化学反应计量式为：

$$-\text{fructose-6-P}-\text{ATP}+\text{fructose-1,6-bisP}=0 \tag{8.4}$$

（6-磷酸果糖）　　　（1,6-二磷酸果糖）

$$-\text{fructose-1,6-bisP}+\text{dihydroxyacetone-P}+\text{glyceraldehyde-3-P}=0 \tag{8.5}$$

（磷酸二羟丙酮）　　　（3-磷酸甘油醛）

如在 3.1 节所讨论的，忽略在第一步反应中形成的 ADP。上述两个反应是 1,6-二磷酸果糖参与的仅有的细胞反应，围绕此代谢物的稳态质量平衡式为：

$$v_1-v_2=0 \tag{8.6}$$

式中，v_1，v_2 分别表示上述两个反应的正反应净速率[1]。因此，第一个反应速率等于第二个反应速率。可以把这两个反应集总进一个总的反应，这个反应将 6-磷酸果糖转化为磷酸二羟丙酮和 3-磷酸甘油醛，正反应速率为 v_1。注意这种集总不改变总的自由度，因为一个反应速率(即一个未知的反应速率)的移除的同时也伴随着一个质量平衡(对 1,6-二磷酸果糖的质量平衡）的消除。无论何时只要是线性序列反应，就能进行类似的反应集总(另一个例子是在 EMP 途径中的 3-磷酸甘油酸到磷酸烯醇丙酮酸的转化)。因此，在建立代谢途径的化学反应计量式时，只需考虑在网络分支点的代谢物，这就使在代谢通量分析中通常用到的化学计量模型的复杂性明显降低。这在例 8.2 中将给以说明。

【例 8.2】 赖氨酸生物合成中代谢通量的确定

表 10.1 更详细地描述了赖氨酸生物合成的代谢网络，有关在这里所考虑的特定反应及其化学反应计算式的更多信息可以参考该表。图 8.2 已经给出各种胞内反应进行的速率，它从每单位时间每克干重细胞微生物消耗 1mol 葡萄糖开始。下述总计量式已分别用于磷酸戊糖途径和三羧酸循环：

$$3\text{Glc6P}+3\text{H}_2\text{O}+6\text{NADP}\rightarrow 3\text{CO}_2+6\text{NADPH}+2\text{Fru6P}+\text{GAP} \tag{1}$$

$$\text{Pyr}+3\text{NAD}+\text{NADP}+\text{FAD}+\text{ADP}\rightarrow 3\text{CO}_2+\text{NADPH}+3\text{NADH}+\text{FADH}+\text{ATP} \tag{2}$$

在 6-磷酸葡萄糖(Glc6P）到 6-磷酸果糖(Fru6P）的方向糖酵解净通量是正的。产物为海藻糖(速率为 r_T)、糖酵解产物(即乳酸、丙氨酸、缬氨酸集总在一起速率为 r_G)、CO_2(速率为 r_{CO_2})及赖氨酸(速率为 r_L)，同时生化合成中要用到葡萄糖(Glc)(速率为 1mol/单位时间)、氨和氧。葡萄糖运输是通过 PTS 系统：

$$\text{Glc}+\text{PEP}\rightarrow\text{Glc6P}+\text{Pyr} \tag{3}$$

单独的反应包括丙酮酸的羧化(通量为 v_6)，PEP 的羧化(通量为 v_3)和 OAA 的脱羧反应(通量为 v_4)。由于这三个反应不能从上述代谢物的测量而独立观察到，通量 v_3，v_4 和 v_6 累加起来得到 $v_8=v_3-v_4+v_6$。通过忽略为生物合成而消耗的代谢物量，可以写出如下平衡式以确定这两个未知的通量分配比 v_1 和 v_2：

海藻糖　$$r_T=1-v_1-v_2 \tag{4}$$

赖氨酸　$$r_L=v_8=v_3-v_4+x_6 \tag{5}$$

糖酵解产物　$$r_G=v_5 \tag{6}$$

NADPH　$0=2v_1-4v_8+z$　［其中 z 为三羧酸循环 TCA 通量，见图 8.2］　(7)

---

[1] 在本章中，胞内反应速率 v 是指正向反应净速率。此速率等于不可逆反应的正向反应速率，也等于可逆反应的正向与逆向反应速率之差。因为本章所考虑的宏观平衡不能区分正向与逆向反应速率，因此用 v 来描述二者之间的差别，即净速率。

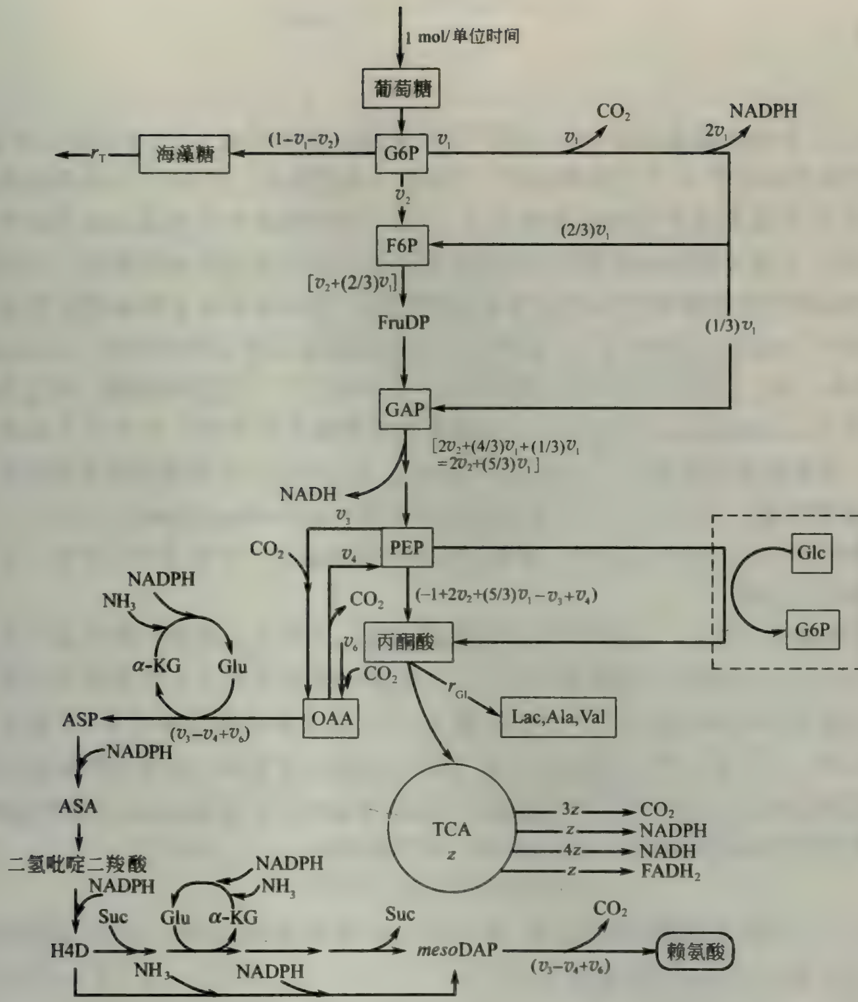


图 8.2 赖氨酸生物合成代谢网络

描述了中间代谢物与流通代谢物的消耗和产生速率。可参考表 10.1 的反应化学计量学。
正通量值表明净通量正向的。平衡式总结于例 8.2 中的式(4)～式(10)
缩写：H4D—六氢吡啶二羧酸；*meso*DAP—消旋二氨基庚二酸

氨 $$r_{amm}=2v_8 \tag{8}$$

CO_2 的释放 $$r_{CO_2}=v_1+3z \tag{9}$$

O_2 的吸收 $$r_{O_2}=(1/2)r_{NADH}=(1/2)(5v_1/3+2v_2+4z) \tag{10}$$

以上方程式对未知数求解可得：

$$v_1=(3/5)(r_G-2+6r_L+2r_T) \tag{11}$$

$$v_2=1-r_T-(3/5)(r_G-2+6r_L+2r_T) \tag{12}$$

$$v_8=r_L \tag{13}$$

$$v_5=r_G \tag{14}$$

就额外的测量数据而言，虽然不能描述羧化作用通量，但对试验数据提供如下的约束：

$$r_{CO_2}+6r_L+3r_G+6r_T=6 \tag{15}$$

$$2r_{O_2}+14r_L+5r_G+12r_T=12 \tag{16}$$

$$r_{amm}=2r_L \tag{17}$$

式（8.3）形成代谢通量分析的基础，即，在胞内速率向量 **v** 中未知途径通量的确定。这个向量方程表示对于 K 个代谢物的 J 个未知数（途径通量）的 K 个线性代数平衡式。因为反应数目（J）总是大于途径代谢物数目（K），该代数方程组有确定的自由度为：$F=J-K$。因此，向量 **v** 中的一些元素必须被测量以便允许其余未知量的确定。反应速率能被测的一个典型例子是葡萄糖到 6-磷酸葡萄糖的转化，可以取其等于葡萄糖的吸收速率。如果 **v** 中恰好 F 个通量(或反应速率)被测定，该系统就成为确定性的系统（determined system）并有惟一解，且能很容易得到(见下面)。如果多于 F 个通量被测量，则这个体系就是超定的系统（overdetermined system），意味着存在着额外的方程，其可用于总体平衡一致性的检验、通量测量的准确度、拟稳态假设证实，及未知胞内更准确的通量的计算。如果少于 F 个通量被测量，那么这个系统就是不定的系统（underdetermined system）。这时，只有在代谢物平衡中引入额外的约束，或者对代谢物平衡施加一个整体优化准则（见 8.3 节），才能确定未知的通量。

在一个确定性系统中，正好 F 个通量（或向量 **v** 中的反应速率）被测量，其余的通量可通过解式（8.3）的线性方程组来计算。引入矩阵代数来描述各个步骤是很方便的。为此目的，通过把测量的速率集中在一个新向量 $\mathbf{v}_m$ 中，向量 **v** 中剩余的元素(其是要计算的速率）集中在另一个向量 $\mathbf{v}_c$ 中，则可求出式（8.3）的解。类似地，通过把测量的反应的计算系数集中在矩阵 $\mathbf{G}_m$ 中，而把其余的反应的计量系数集中在矩阵 $\mathbf{G}_c$ 中，从而对矩阵 **G** 的化学计量系数作了上述的分配。于是式（8.3）可以改写为：

$$0=\mathbf{G}^T\mathbf{v}=\mathbf{G}_m^T\mathbf{v}_m+\mathbf{G}_c^T\mathbf{v}_c \tag{8.7}$$

因为正好 $F=J-K$ 个通量被测量，$\mathbf{G}_c$ 是一个方阵(维数为 $K\times K$)，而且如果矩阵能够求逆(见下文)，则 $\mathbf{v}_c$ 的元素可以表示为：

$$\mathbf{v}_c=-(\mathbf{G}_c^T)^{-1}\mathbf{G}_m^T\mathbf{v}_m \tag{8.8}$$

在例 8.3 中将证明示范矩阵代数在通量确定中的应用，而且甚至已经用上述方法表示每一个矩阵已提供一个模板以便于这个方法对其它系统的应用。

【例 8.3】 利用解脂假丝酵母（*C. lipolytica*）进行柠檬酸发酵的代谢通量分析

为了进一步阐述代谢通量分析的概念，考虑 Aiba 和 Matsuoka（1979）进行的利用 *C. lipolytica* 生产柠檬酸研究，其可能是利用代谢物平衡来处理发酵数据的第一个应用。在他们的分析中，Aiba 和 Matsuoka 利用如图 8.3 所示的简化了的代谢网络，包括 EMP 途径、TCA 循环、乙醛酸支路、丙酮酸羧化和主要大分子库（即蛋白质、碳水化合物和脂类等）形成。当柠檬酸和异柠檬酸被分泌到胞外培养基中时，为了补充 TCA 循环中的代谢物，这两条回补途径显然是必须的。

注意此模型的结构，特别是一些代谢产物，例如被描述为代谢中间物的柠檬酸、异柠檬酸。分泌反应（图 8.3 中用虚线所示）的引入允许拟稳态假设可应用于所有途径的中间代谢物。CO_2 参与几个反应，因此 CO_2 作为胞内化合物也被包括并以速率 v_{16} 被分泌。围绕 CO_2 也可引入一个平衡式。用这种模型结构，一些通量能被直接测定。

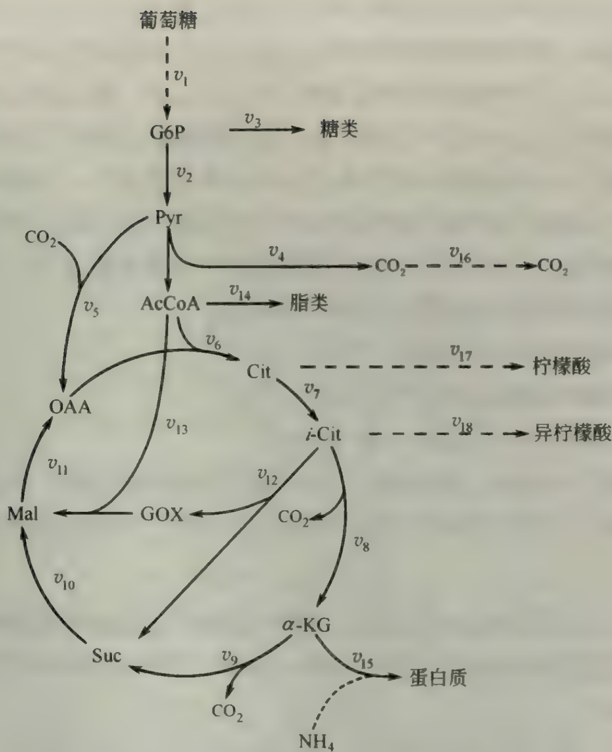


图 8.3 简化的 *C. lipolytica* 代谢网络

缩写：G6P—6-磷酸葡萄糖；Pyr—丙酮酸；AcCoA—乙酰辅酶 A；OAA—草酰乙酸；Cit—柠檬酸；*i*-Cit—异柠檬酸；α-KG—α-酮戊二酸；Suc—琥珀酸；Mal—苹果酸；GOX—乙醛酸

虚线表示运输反应，而实线表示胞内反应

单个反应的化学计量式是相当简单的，因为除了葡萄糖到丙酮酸的转化外，其余的化学计量系数都为 1 或 −1。对网络（见图 8.3）中所有的分支点应用拟稳定状态假设，对所有单个反应的速率可以非常容易得出方程式（1）～式(11)。所有反应速率单位均为每克干重生物体在每小时内形成该化合物的摩尔 $[\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}(\text{干重})\cdot\text{h}^{-1}]$。

G6P:	$v_1 - v_2/2 - v_3 = 0$	(1)
Pyr:	$v_2 - v_4 - v_5 = 0$	(2)
AcCoA:	$v_4 - v_6 - v_{13} - v_{14} = 0$	(3)
Cit:	$v_6 - v_7 - v_{17} = 0$	(4)
i-Cit:	$v_7 - v_8 - v_{12} - v_{18} = 0$	(5)
α-KG:	$v_8 - v_9 - v_{15} = 0$	(6)
Suc:	$v_9 - v_{10} + v_{12} = 0$	(7)
Mal:	$v_{10} - v_{11} + v_{13} = 0$	(8)
GOX:	$v_{12} - v_{13} = 0$	(9)
OOA:	$v_5 + v_{11} - v_6 = 0$	(10)
CO_2:	$v_4 + v_8 + v_9 - v_{16} = 0$	(11)

注意，反应（13）应该已被删除，因为对乙醛酸应用拟稳态假设表明这个反应速率等于 v_{12}。

用 18 个反应速率和 11 个平衡方程，则可得自由度为 7。因此，如果有 7 个反应速率被

测定，那么其它的反应速率就可以计算出来。在 Aiba 和 Matsuoka 的分析中，他们测量了网络中的 6 个反应速率：葡萄糖的吸收速率（$r_{glc}=v_1$）、CO_2 产生速率($r_c=v_{16}$)、柠檬酸的产生速率（$r_{cit}=v_{17}$)、异柠檬酸的产生速率（$r_{ict}=v_{18}$)、蛋白质合成速率（$r_{prot}=v_{15}$）和碳水化合物合成速率（$r_{car}=v_3$)（下标：glc 表示葡萄糖；c 表示二氧化碳；cit 表示柠檬酸；ict 表示异柠檬酸；car 表示碳水化合物，prot 表示蛋白质——译者注)。其中速率 r_{prot} 和 r_{car}通过分别测量生物质（在稳定的恒化器中）中的蛋白质和碳水化合物含量而可得到。除这 6 个测量外，他们通过设定网络中的反应速率之一为零而施加了一个约束条件。检验了三种不同情况，反映柠檬酸生物化学的三种不同模型：

- 模型 1：乙醛酸支路是无活性的，即 $v_{12}=0$。
- 模型 2：丙酮酸羧化酶是无活性的，即 $v_5=0$。
- 模型 3：TCA 循环是不完全的，即 $v_9=0$。

用上述 6 个已测定的速率，准确确定了每个模型对应的方程组，解这些方程组就可确定未知的反应速率。通过不断地消除未知速率来进行，比如，可以迅速发现

$$v_2=2(r_{glc}-r_{car}) \tag{12}$$

对其它反应速率也可以得到类似的表达式。一种更普遍的方法是利用矩阵代数来计算。下面将阐述在模型 1 的情况下如何计算未知的通量。为此，首先利用化学计量矩阵 **G** 以矩阵形式重写式(1)～式(11)：

$$\begin{pmatrix}
1 & -0.5 & -1 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0\\
0 & 1 & 0 & -1 & -1 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0\\
0 & 0 & 0 & 1 & 0 & -1 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & -1 & -1 & 0 & 0 & 0 & 0\\
0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 1 & -1 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & -1 & 0\\
0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 1 & -1 & 0 & 0 & 0 & -1 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & -1\\
0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 1 & -1 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & -1 & 0 & 0 & 0\\
0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 1 & -1 & 0 & 1 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0\\
0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 1 & -1 & 0 & 1 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0\\
0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 1 & -1 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0\\
0 & 0 & 0 & 0 & 1 & -1 & 0 & 0 & 0 & 0 & 1 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0\\
0 & 0 & 0 & 1 & -1 & 0 & 0 & 1 & 1 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & -1 & 0 & 0
\end{pmatrix}\mathbf{v}=\begin{pmatrix}0\\0\\0\\0\\0\\0\\0\\0\\0\\0\\0\end{pmatrix} \tag{13}$$

当速率 v_1、v_3、v_{15}、v_{16}和 v_{17}被测量（即由相应署名的 r 变量来表示)，并且没有异柠檬酸分泌（即 $v_{18}=0$）时，在模型 1 的情况，v_{12}被设定为 0，第 1、3、12、15、16、17 和 18 列被集中在矩阵 $\mathbf{G}_m$ 中，而剩余的列被集中在矩阵 $\mathbf{G}_c$ 中，于是由式（8.8）得出

$$\begin{pmatrix}v_2\\v_4\\v_5\\v_6\\v_7\\v_8\\v_9\\v_{10}\\v_{11}\\v_{13}\\v_{14}\end{pmatrix}=-\begin{pmatrix}
-0.5 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0\\
1 & -1 & -1 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0\\
0 & 1 & 0 & -1 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & -1 & -1\\
0 & 0 & 0 & 1 & -1 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0\\
0 & 0 & 0 & 0 & 1 & -1 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0\\
0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 1 & -1 & 0 & 0 & 0 & 0\\
0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 1 & -1 & 0 & 0 & 0\\
0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 1 & -1 & 1 & 0\\
0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & -1 & 0\\
0 & 0 & 1 & -1 & 0 & 0 & 0 & 0 & 1 & 0 & 0\\
0 & 1 & -1 & 0 & 0 & 1 & 1 & 0 & 0 & 0 & 0
\end{pmatrix}^{-1}$$

$$
\times \begin{pmatrix} 1 & -1 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & -1 & 0 \\ 0 & 0 & -1 & 0 & 0 & 0 & -1 \\ 0 & 0 & 0 & -1 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 1 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 1 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & -1 & 0 & 0 \end{pmatrix} \begin{pmatrix} r_{glc} \\ r_{car} \\ 0 \\ r_{prot} \\ r_c \\ r_{cit} \\ r_{ict} \end{pmatrix} \tag{14}
$$

或

$$
\begin{pmatrix} v_2 \\ v_4 \\ v_5 \\ v_6 \\ v_7 \\ v_8 \\ v_9 \\ v_{10} \\ v_{11} \\ v_{13} \\ v_{14} \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} 2 & -2 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 2 & -2 & 1 & -1 & 0 & -1 & -1 \\ 0 & 0 & -1 & 1 & 0 & 1 & 1 \\ -1 & 1 & 0 & 1.5 & 0.5 & 2 & 2 \\ -1 & 1 & 0 & 1.5 & 0.5 & 1 & 2 \\ -1 & 1 & -1 & 1.5 & 0.5 & 1 & 1 \\ -1 & 1 & -1 & 0.5 & 0.5 & 1 & 1 \\ -1 & 1 & 0 & 0.5 & 0.5 & 1 & 1 \\ -1 & 1 & 1 & 0.5 & 0.5 & 1 & 1 \\ 0 & 0 & 1 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 3 & -3 & 0 & -2.5 & -0.5 & -3 & -3 \end{pmatrix} \begin{pmatrix} r_{glc} \\ r_{car} \\ 0 \\ r_{prot} \\ r_c \\ r_{cit} \\ r_{ict} \end{pmatrix} \tag{15}
$$

应注意该解的复杂性，即胞内通量是几乎全部所测量的速率的函数。在这种情况，利用高斯消去法来解上述代数方程组可能是非常烦琐的，而矩阵方程则可以利用计算机程序（如 Mathemetica，Mable 或 Matlab 等）容易地求解。从式（15）的第一行可看出 v_2 的解与式(12) 给出的解相同。显然，当乙醛酸支路是无活性时，$v_{13}=0$、$v_{10}=v_{11}$。通过计算稳定状态恒化器中不同稀释速率（即不同组的测量的速率）时的未知速率（或通量），Aiba 和 Matsuoka（1979）得出结论：模型 1 所描述的通量是合理的。此外，在四种不同酶（丙酮酸羧化酶、柠檬酸合成酶、异柠檬酸脱氢酶和异柠檬酸裂解酶）的体外活性测量与所计算的通量关联得相当好。当检验其它两种模型时，发现一些通量是负的，如，模型 2 预测 α-酮戊二酸被转化为异柠檬酸。这不是不可能，但是大多数反应在热力学被证明是按图 8.3 中箭头所示的方向进行的。这样，从异柠檬酸到 α-酮戊二酸转化的 ΔG^0 是 $-20.9\ \mathrm{kJ \cdot mol^{-1}}$，而要使反应逆向进行，会需要很大的 α-酮戊二酸对异柠檬酸的浓度比。此外，用模型 1 在所测量的酶活性与所预测的通量之间的拟合程度比其它两种模型都好。Aiba 和 Matsuoka (1979) 因而做出结论：在柠檬酸生产条件下 *C. lipolytica* 中乙醛酸途径是没活性的或者是以很低的速率在运行。

式（8.8）实际上表示，当利用矩阵符号表示法（见方框 4.2）来解 K 个线性代数方程组时所得的结果。对于惟一解的需要是该代数方程组必须是线性无关的，即方程组中没有一个方程是其它方程的线性组合。这种线性独立对 $\mathbf{G}_c$ 矩阵求逆是必要的，而且通过确定矩阵的秩就很容易检验。因此，只要矩阵满秩（等于 K），即，矩阵 $\mathbf{G}_c$ 的行列式值不为零，则矩

阵就可求逆，未测量的通量就能计算。如果矩阵 $\mathbf{G}_c$ 的秩小于 K，则该矩阵为奇异矩阵，这意味着矩阵 $\mathbf{G}_c$ 的行列式值为零，则用式（8.8）得不到解，在这种情况下，本质上我们正在涉及一个不定系统。

矩阵 $\mathbf{G}_c$ 的秩可能小于 K 主要有两个原因：

（1）集中在矩阵 $\mathbf{G}_c$ 中的反应计量方程组（例如由几行组成的一组）是线性相关的，即包括在矩阵 $\mathbf{G}_c$ 的一行或多行可以写成其它行的线性组合。在一个代谢网络中各反应计量式是否存在线性相关可很容易地通过确定总化学计量矩阵 $\mathbf{G}$ 的秩来检验。如果 $\mathbf{G}$ 为满秩，也就是 rank（$\mathbf{G}$）$= K$，则表明至少存在一个方阵子矩阵其能用于求逆计算。如果 rank（$\mathbf{G}$）$< K$，则矩阵 $\mathbf{G}_c$ 的行中至少有一行与其它行线性相关。由于代谢网络中通常存在大量反应，因此各化学反应计量式之间的线性相关性问题是经常产生的（见例 8.4）。在这些情况下，有必要消除所有线性相关的反应和（或）在求解程序中包括额外的信息。

（2）即使矩阵 $\mathbf{G}$ 是满秩，也有可能测量数据组以这样的方式被选择，以致 $\mathbf{G}_c$ 有一个小于 K 值的秩。在这种情况下，一些已测量的速率是多余的。它们可以用于一致性检验，但仅仅是在不同测量数据组首先被用以确定未知通量之后（详见例 8.5）。

【例 8.4】 线性相关的化学反应计量式

因为大多数活性细胞能够利用许多种化合物作为碳源、能源和氮源，因此存在着很多互补途径，如果它们同时在运行则会起类似的作用。当进行代谢通量分析时，所有这样一些途径的包含会引起能观测性问题，这意味着这些途径通常仅胞外测量是不可辨识的。由此，不可观测的途径表现为线性相关的化学反应计量式。许多最常遇到的问题是由于如下一条或多条代谢路线所引起的：

- 原核生物中的乙醛酸循环
- 经由 GS-GOAT 系统的氮同化作用
- 转氢酶系
- 异构酶系

在原核生物中，TCA 循环和所有补给反应（包括乙醛酸循环）都是在胞质基质中进行的。通常，乙醛酸循环被认为是 TCA 循环的一条旁路，这是因为它与 TCA 循环共享许多反应（见图 2.10）。然而，这两条途径具有非常不同的目的：TCA 循环有把丙酮酸氧化为 CO_2 的目的，而乙醛酸循环有合成前体代谢物的目的，例如，由乙酰辅酶 A 合成草酰乙酸。仅考虑这二者本身，TCA 循环和乙醛酸循环不存在线性相关性，但是如果包括其它补给途径（例如丙酮酸羧化酶），则奇异性会产生。这可通过对三个途径写出集总的反应来举例说明（见图 2.10 对于途径总览）。在所有的情况下，我们用丙酮酸作为起点。

TCA 循环：　$-\text{pyruvate}+3CO_2+\text{NADH}+\text{FADH}_2+\text{GTP}=0$　(1)

乙醛酸循环：　$-2\text{pyruvate}+2CO_2+\text{oxaloacetate}+4\text{NADH}+\text{FADH}_2=0$　(2)

（草酰乙酸）

丙酮酸羧化酶：　$-\text{pyruvate}-\text{ATP}-CO_2+\text{oxaloacetate}=0$　(3)

如果 ATP 和 GTP 汇集在一起（在胞内反应的分析中经常这样做），则很显然乙醛酸循环是其它两个途径的线性组合，并且通过通量分析不能独立确定所有这三个途径。要决定该消除哪一条途径是很困难的任务，而且如图 8.4 所示，当或者包括 TCA 循环，或者包括乙醛酸循环时，两种情况所计算出的通量分布可能完全不同。但幸运的是，这些途径很少同时

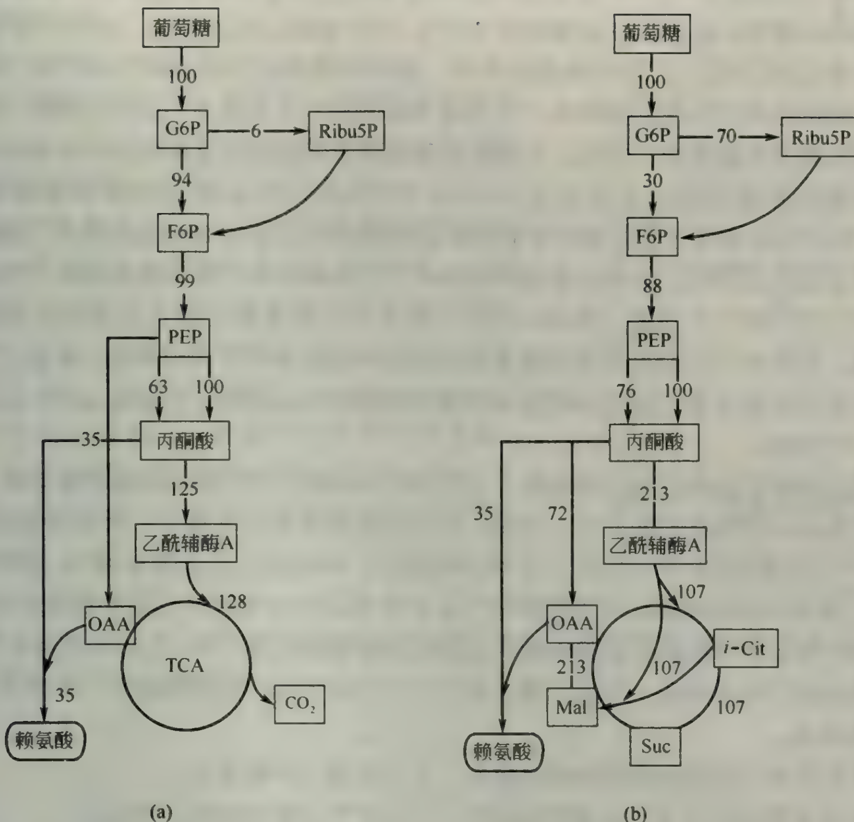


图 8.4　在谷氨酸棒杆菌（*C.glutamicum*）中，赖氨酸摩尔得率为 0.35 时所需的理论通量分布

通量是通过使用 Vallino and Stephanopoulos（1993）的化学计量模型而计算出来的（见 10.1 节）

磷酸烯醇丙酮酸和丙酮酸之间的两个通量分别对应着丙酮酸激酶（a）和葡萄糖 PTS 运输系统（b）催化的反应

（a）TCA 循环有活性而乙醛酸循环无活性的通量分布；（b）乙醛酸循环有活性而 TCA 循环无活性的通量分布

Ribu5P：5-磷酸核酮糖

运行，因为它们的酶是被不同地诱导的。关于相应酶活性的诱导和调节的信息对于在一组环境条件下要考虑的准确途径做出一个有根据的决定是非常关键的。例如，在很多微生物中异柠檬酸裂解酶（乙醛酸循环的第一个酶）的表达受葡萄糖的抑制，以致乙醛酸循环的可能性可以因在葡萄糖中生长而被消除。在真核细胞中，乙醛酸循环没有引起线性相关性，这是由于不同反应的分区化，即 TCA 循环在线粒体中运行，而乙醛酸循环或者在胞液中或者在微体中进行。所有三条路线都包括在 Aiba 和 Matsuoka（1979）的分析中，但在所考虑的三种模型中，在每一模型中的三条路线之一是无活性的。在例 8.2 对 Aiba 和 Matsuoka 的模型的处理中，已把所有三条途径的化学计量式包括在总的计量矩阵中，但在求解时，则把这些途径之一（用乙醛酸支路来举例说明）的计量式收集在子矩阵 $\mathbf{G}_m$ 中，因为这个通量被设定为零。另外，应该从网络中消除这条途径的反应计量式，但这会导致同解。

线性相关反应的另一个例子是两条氨同化路线：谷氨酸脱氢酶反应和 GS-GOGAT 系统（见 2.4.1 节），这两条路线的化学计量式是

GDH：$-\alpha$-ketoglutarate − NH_3 − NADPH + glutamate = 0　　(4)

（α-酮戊二酸）　　（谷氨酸）

GS-GOGAT：$-\alpha$-ketoglutarate − NH_3 − NADPH − ATP + glutamate = 0　　(5)

可见，二者惟一的差别在于ATP用于GS-GOGAT路线（其是高亲和力系统）而没用于GDH反应。这里的问题是，由于缺少足够的有关所有ATP消耗反应的信息，因而不易写出ATP平衡。在二者之间以缺乏ATP平衡进行区分，这两条氮同化反应是线性相关的，因此是不可观测的。因为这两条路线之间的惟一差别是GS-GOGAT系统中ATP的消耗，两条路线之间的差别可能是不重要的，因此，它们常被集总进化学反应计量模型的一个单个反应中。

可能导致奇异性的另一个反应是NADH与NADPH互相转化的转氢酶反应［见式(2.4)］。在该反应存在时，两个辅因子的平衡式是耦合的，显然变成线性相关。虽然报道转氢酶系存在于很多生物体，但是在正常生长条件下这些酶通常不是非常活泼的。然而，在某些条件下已对它们进行了分析（见10.1节），而且它们在耗散大量NADPH过程中起非常重要的作用，而这些NADPH是在非常高的戊糖循环活性条件下所形成的。在此，重要的一点是能通过化学计量平衡式缺乏一致性而发现转氢酶活性的存在，这也是MFA应用于超定系统的另一个特征。

在很多生物中存在着不同的同功酶，它们催化相同的反应但利用不同的辅助因子。一个熟知的例子就是谷氨酸脱氢酶反应，为此，很多细胞有两种同功酶，一种连接到NADH作为辅助因子（叫做GDH-NADH），另一种连接到NADPH作为辅助因子（叫做GDH-NADPH）。如果这两种酶都是可供使用的，它们将都充当转氢酶反应而导致奇异性。然而，GDH-NADH主要参与氨基酸分解代谢并且因此受葡萄糖抑制，而GDH-NADPH主要参与谷氨酸合成并被谷氨酸抑制。取决于微生物生长的环境条件，这两种酶之一因此常可在网络表述中不加考虑。

如果在化学反应计量矩阵中出现奇异性，人们有如下两种选择。

（1）借用有关特定酶调节与诱导的信息，从模型中去除线性相关的反应。

（2）引入附加的信息，例如两条途径的相对通量。这些信息可以从酶活性的测定中获得，例如在两条路线中关键酶的相对活性。然而，这种方法由如下事实而受阻：体外酶活性的测定常被发现与实际的体内通量分布几乎没有显示什么关系。另一个强有力的方法是标记底物的应用，例如，^{13}C-富集的葡萄糖，接着进行在不同产物中^{13}C标记分布的NMR测定。这种方法能够提供关于通过线性相关途径的通量分布所缺少的信息（见第9章）。

【例8.5】 乳酸菌的异型发酵代谢

乳酸菌通常是在富含氨基酸（如酵母抽提物、酪蛋白胨等）的复合培养基上生长，为生化合成提供碳骨架。因此在合成代谢途径中没有（或极少）氧化还原当量的净消耗。这导致在从能源（葡萄糖或乳糖）到初级代谢产物（如乳酸、乙醇、乙酸、甲酸和CO_2）的转化过程中氧化还原当量的储备。乳酸菌所利用的分解代谢途径（见图8.5）因此与乳酸菌的生长是解耦的，因此可以单独进行分析。因为菌体在复杂培养上生长时可以忽略用于菌体生长所消耗的前体代谢物，故EMP途径可以看做是没有分支点的直线途径，以致从葡萄糖到丙酮酸之间的所有中间产物都像本章早些时候讨论的那样被消除。在好的生长条件下，一些乳酸菌仅利用从葡萄糖到乳酸的途径，常称为同型发酵代谢，因为产生单一产物。此时氧化还原平衡完全闭合，因为在葡萄糖到丙酮酸的转化中生成的NADH在丙酮酸到乳酸的转化中又被再生。然而，在极端饥饿的条件下，细胞力求从分解代谢反应中获得更多ATP，这可以通过把一些丙酮酸引向乙酸来实现。但在这种情况下，导致氧化还原不平衡，需要一部分丙酮酸被引向乙醇而再生NAD^+。因此，为了在葡萄糖分解代谢途径中获得更多ATP，形成

几种代谢产物，这种情况下的代谢被称为异型发酵(或称混合酸发酵)。

丙酮酸显然是一个途径分支节点代谢物，因此，围绕这个代谢物可以建立一种平衡。在丙酮酸到代谢产物的转化中，包括三种其它中间代谢物：乙酰辅酶A、乙酰磷酸和乙醛。其中，只有乙酰辅酶A位于一个分支点而需要考虑。最后，在分解代谢途径中氧化还原当量的储存产生一个附加的NADH平衡。人们也可以建立一个关于NAD^+的平衡，但是因这种化合物总是连接到NADH，这样的平衡与NADH平衡会是线性相关的，其不会提供更多的信息。注意，ATP的平衡也可以建立，但因为只考虑分解代谢，其中没有ATP消耗，因此这个平衡是不闭合的。总之，在乳酸途径分析中，涉及三个途径代谢物（丙酮酸、乙酰辅酶A和NADH），一个底物（葡萄糖）和五个代谢产物（乳酸、CO_2、甲酸、乙酸和乙醇）。根据一般式（3.4），在该途径中所考虑的六个反应的化学计量式可表述如下（注意：署名的变量r表示相应代谢物的胞外累积速率，同时因所有的通量都能直接测量，因此用比速率r_i代替胞内通量v_i）。

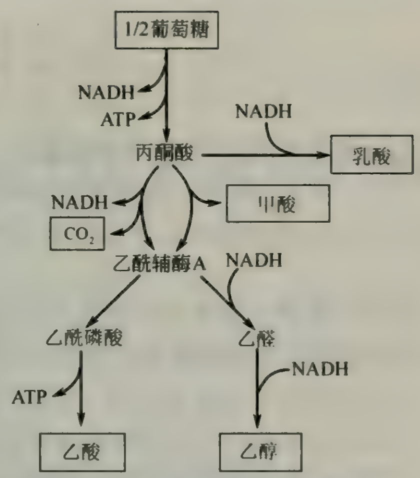


图8.5 乳酸菌的分解代谢

$$\begin{pmatrix} -\frac{1}{2} \\ 0 \\ 0 \\ 0 \\ 0 \\ 0 \end{pmatrix} S_{glc} + \begin{pmatrix} 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 1 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 1 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 1 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 1 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 1 \end{pmatrix} \begin{pmatrix} P_{lac} \\ P_{CO_2} \\ P_{for} \\ P_{ac} \\ P_{et} \end{pmatrix} + \begin{pmatrix} 1 & 0 & 1 \\ -1 & 0 & -1 \\ -1 & 1 & 1 \\ -1 & 1 & 0 \\ 0 & -1 & 0 \\ 0 & -1 & -2 \end{pmatrix} \begin{pmatrix} X_{Pyr} \\ X_{AcCoA} \\ X_{NADH} \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} 0 \\ 0 \\ 0 \\ 0 \\ 0 \\ 0 \end{pmatrix} \tag{1}$$

式中，下标lac—乳酸；for—甲酸；ac—乙酸；et—乙醇；Pyr—丙酮酸；AcCoA—乙酰辅酶A。

利用式（1）的化学反应计量关系，并对三个胞内化合物（丙酮酸，乙酰辅酶A和NADH）应用拟稳态假设，可得如下的线性方程：

$$\begin{pmatrix} 0 \\ 0 \\ 0 \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} 1 & -1 & -1 & -1 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 1 & 1 & -1 & -1 \\ 1 & -1 & 1 & 0 & 0 & -2 \end{pmatrix} \begin{pmatrix} r_{Pyr} \\ r_{lac} \\ r_c \\ r_{for} \\ r_{ac} \\ r_{et} \end{pmatrix} \tag{2}$$

上述方程中的第一个（对应于矩阵中第一行）是丙酮酸平衡，第二个为乙酰辅酶A平衡，最后一个是NADH平衡。注意到，在这个例子中，该途径中的所有通量，实际上能够直接由底物吸收通量和产物分泌通量的测量来确定。然而，这是一个相当例外的情况，正如例8.3所说明的，其中有几个通量不能直接观测到。

在这条途径中没有线性相关的反应，这可通过矩阵**G**的秩来证实，因为已求出它的秩为3。因此，可以找出一组三个已测的速率用来求解未知的速率。如果我们选择这三个已测

速率为葡萄糖（从中 r_{Pyr}被确定为 $2r_{glc}$）、乳酸和甲酸，利用式（8.8）可得：

$$\begin{pmatrix}0\\0\\0\end{pmatrix}=\begin{pmatrix}1&-1&-1\\0&0&1\\1&-1&0\end{pmatrix}\begin{pmatrix}r_{Pyr}\\r_{lac}\\r_{for}\end{pmatrix}+\begin{pmatrix}-1&0&0\\1&-1&-1\\1&0&-2\end{pmatrix}\begin{pmatrix}r_c\\r_{ac}\\r_{et}\end{pmatrix} \tag{3}$$

最后一个矩阵（$\mathbf{G}_c^T$）有一个不等于零的行列式，因此对它求逆得到：

$$\begin{pmatrix}r_c\\r_{ac}\\r_{et}\end{pmatrix}=-\begin{pmatrix}-1&0&0\\1&-1&-1\\1&0&-2\end{pmatrix}^{-1}\begin{pmatrix}1&-1&-1\\0&0&1\\1&-1&0\end{pmatrix}\begin{pmatrix}r_{Pyr}\\r_{lac}\\r_{for}\end{pmatrix}$$

$$=\begin{pmatrix}1&-1&-1\\0&0&\frac{1}{2}\\1&-1&-\frac{1}{2}\end{pmatrix}\begin{pmatrix}r_{Pyr}\\r_{lac}\\r_{for}\end{pmatrix} \tag{4}$$

可以观察到在形成 2mol 甲酸的同时会得到 1mol 乙酸。这两个胞外代谢物生成速率之间的固定比例可以通过 NADH 平衡来解释：当乙酰辅酶 A 与甲酸一起生成时，每生成 1mol 乙酰辅酶 A 就必须正好再生 1mol NAD^+（即，EMP 途径中所用的 NAD^+），因此，来自乙酰辅酶 A 的通量在乙醇生成（在此两个 NAD^+ 分子被再生）和乙酸生成之间平均分配。类似地，如果没有甲酸生成，则丙酮酸到乙酰辅酶 A 的转化仅通过丙酮酸脱氢酶路线，这导致另外的 NADH 产生。在这种情况下，所有的乙酰辅酶 A 必须被引向乙醇，在这里所需的 NAD^+ 被再生。

根据前面已测的葡萄糖（等于丙酮酸速率的 1/2）、乳酸和甲酸的速率，在确定式（4）的通量时不存在困难。然而，如果选择葡萄糖、乙酸和甲酸进行测量，则有：

$$\det(\mathbf{G}_c^T)=\begin{vmatrix}-1&-1&0\\0&1&-1\\-1&1&-2\end{vmatrix}=0 \tag{5}$$

换句话说，上述测量不能用来惟一地计算剩下的三个未知途径通量，即乳酸、CO_2 和乙醇的通量。原因自然是用甲酸、乙酸作为仅有的代谢产物的测量时，没有关于 NADH 消耗速率的信息（通量 r_{lac}、r_c或 r_{et}中的一个必须被测量）而 NADH 平衡是没有用的。因此，甲酸和乙酸的通量的测定没有提供附加的信息，因为一个可以从另一个确定。注意到，没有必要去计算行列式的值（即使利用商业数学软件包这很容易做），因为很容易观察到最后一行可以被写成：行 3=行 1+2（行 2）。

8.2　超定系统

在 8.1 节，对完全确定性系统我们发展了通量分析的方法。然而，常常有这样的情况，多于系统自由度的通量测量是可以利用的。这就自然产生了超定系统，在该系统中，类似于 4.4 节对黑箱模型的处理，利用冗余变不仅能计算未测通量的更好的估计值，也能计算已测量通量的更好的估计值。此外，用超定系统有可能对胞内代谢物验证稳态假设的有效性。

在超定系统情况下，式（8.8）中的矩阵 $\mathbf{G}_c^T$是非方形矩阵，因此不能求逆，通过利用其 Moore-Perose 拟-逆矩阵（见 4.4 节），可得一个简单解：

$$v_c = -(\mathbf{G}_c^T)^{\#}\mathbf{G}_m^T\mathbf{v}_m \tag{8.9}$$

其中，$(\mathbf{G}_c^T)^{\#}$是 $\mathbf{G}_c^T$ 的拟-逆矩阵

$$(\mathbf{G}_c^T)^{\#} = (\mathbf{G}_c\mathbf{G}_c^T)^{-1}\mathbf{G}_c \tag{8.10}$$

式（8.9）当然可以使用，只要矩阵 $\mathbf{G}_c\mathbf{G}_c^T$ 是非奇异矩阵，这是当矩阵 $\mathbf{G}_c$ 是满秩时所满足的一个条件。这样，对一个超定系统的解的要求与对确定性系统的要求是一样的。对于一个方形矩阵，其拟-逆矩阵同它的逆矩阵是一样的，当测量数目大于或等于系统自由度时，式(8.9）是式（8.7）的通解。

当测量中噪声很小时式（8.9）是非常有用的。它代表对非测量通量在如下假设下的最小二乘估计，该假设是：由测量噪声所引起的约束残差被均匀分布于系统的约束（即胞内代谢物的拟稳态平衡）当中。然而，如果显著的噪声存在于仅仅一些已测通量中，式（8.9）的解不满足围绕某些网络节点的通量守恒，这意味着流进该节点的通量之和与流出该节点的通量之和不相等。在研究通量分布中这显然是有问题的，因此我们期望识别通量测量中所包含的过失误差（其类似于 4.4 节中黑箱的处理）。因为式（8.7）类似于由式（4.10）给出的元素平衡式，因此 4.4 节的分析完全可用在这里。首先计算冗余矩阵：

$$\mathbf{R} = \mathbf{G}_m - \mathbf{G}_c\mathbf{G}_c^{\#}\mathbf{G}_m \tag{8.11}$$

由此可确定简化的冗余矩阵，其被用于类似于式(4.15)～式（4.17）所概述的计算中，例 4.6 对此已经阐述。

一个稍微不同的程序［由 Tsai 和 Lee（1988）给出］可对未测量的和已测量的通量二者提供更好的估计。为此目的，式（8.7）被重新构成以解释：

$$\begin{pmatrix}\mathbf{v}_m\\0\end{pmatrix} = \begin{pmatrix}\mathbf{I} & 0\\ \mathbf{G}^T & \end{pmatrix}\begin{pmatrix}\mathbf{v}_m\\ \mathbf{v}_c\end{pmatrix} = \mathbf{T}\mathbf{v} \tag{8.12}$$

式中，$\mathbf{I}$ 是单位矩阵，它的维数等于已测通量的个数。式(8.12)中第一行简单地规定 $\mathbf{v}_m = \mathbf{v}_m$，然而第二行等同于式(8.7)。文献中大多数代谢模型有或能很容易简化为式(8.12)的形式。在这种形式中，式(8.12)在所计算的通量向量 $\mathbf{v}_c$ 和已测量的通量向量 $\mathbf{v}_m$ 之间引入严格的分离，而且通过测量噪声的消除不允许对所测量的通量有任何改进。这可通过通量向量更一般的分配来完成，由此，已测量的和未测量的通量不被分离：

$$\begin{pmatrix}\mathbf{v}_m\\0\end{pmatrix} = \begin{pmatrix}\mathbf{T}_{11} & \mathbf{T}_{12}\\ \mathbf{T}_{21} & \mathbf{T}_{22}\end{pmatrix}\begin{pmatrix}\mathbf{v}_1\\ \mathbf{v}_2\end{pmatrix} \tag{8.13}$$

上述方程的第二行清楚地反映稳态代谢物平衡。矩阵 $\mathbf{T}_{11}$和 $\mathbf{T}_{12}$均由单位矩阵确定，并且 $\mathbf{G}^T$ 如例 8.6 中所述。可选择向量 $\mathbf{v}_1$和 $\mathbf{v}_2$分别等于 $\mathbf{v}_m$ 和 $\mathbf{v}_c$（此情况下该方法等同于先前的方法），或者不这样，只要矩阵 $\mathbf{T}_{22}$能被求逆以产生以 $\mathbf{v}_1$ 表示的向量 $\mathbf{v}_2$ 的解：

$$\mathbf{v}_2 = -\mathbf{T}_{22}^{-1}\mathbf{T}_{21}\mathbf{v}_1 \tag{8.14}$$

当将这个方程代入式(8.13)，在已测量的速率 $\mathbf{v}_m$ 与 $\mathbf{v}_1$ 的元素之间的关系得出如下：

$$\mathbf{v}_m = \mathbf{T}_r\mathbf{v}_1 \tag{8.15}$$

其中，$\mathbf{T}_r$ 由下式给出

$$\mathbf{T}_r = \mathbf{T}_{11} - \mathbf{T}_{12}\mathbf{T}_{22}^{-1}\mathbf{T}_{21} \tag{8.16}$$

式（8.15）表示一个超定系统，就像原始的平衡方程一样。而且，如果测量误差以正态分布且平均值为零及方差-协方差矩阵等于 **F**，于是对 $\mathbf{v}_1$ 的元素的最大似然估计由 Madron 等（1977）给出如下：

$$\hat{\mathbf{v}}_1=(\mathbf{T}_r^T\mathbf{F}^{-1}\mathbf{T}_r)^{-1}\mathbf{T}_r^T\mathbf{F}^{-1}\mathbf{v}_m \tag{8.17}$$

式中，$\mathbf{v}_1$ 上方“ ^”符号表示对于正态分布的测量误差相应量的最好估计。通过把式（8.17）代入式（8.14）可得 $\mathbf{v}_2$ 的元素的估计值，$\hat{\mathbf{v}}_2$ 为：

$$\hat{\mathbf{v}}_2=-\mathbf{T}_{22}^{-1}\mathbf{T}_{21}\hat{\mathbf{v}}_1 \tag{8.18}$$

式（8.17）和式（8.18）给出该代谢模型中所有通量的最好估计，即：那些已测量的通量和未测量的通量。通常不易得到方差与协方差的信息，但如果在已测量的通量中的误差具有相同的数量级并且是不相关的，人们就可对 $\mathbf{v}_1$ 的元素利用最小二乘估计：

$$\hat{\mathbf{v}}_1=(\mathbf{T}_r^T\mathbf{T}_r)^{-1}\mathbf{T}_r^T\mathbf{v}_m \tag{8.19}$$

【例 8.6】 超定系统的通量确定

现在回到在例 8.5 中处理的乳酸菌的异型发酵代谢，并且考虑四个速率已被测量的情况，因此产生一个超定系统。如果丙酮酸的生产速率（等于 $2r_{glc}$）、乳酸生产速率（r_{lac}）、甲酸生产速率（r_{for}）和乙醇生产速率（r_{et}）的测量都是可利用的，则式（8.7）变为：

$$\begin{pmatrix}0\\0\\0\end{pmatrix}=\begin{pmatrix}1&-1&-1&0\\0&0&1&-1\\1&-1&0&-2\end{pmatrix}\begin{pmatrix}r_{Pyr}\\r_{lac}\\r_{for}\\r_{et}\end{pmatrix}+\begin{pmatrix}-1&0\\1&-1\\1&0\end{pmatrix}\begin{pmatrix}r_c\\r_{ac}\end{pmatrix} \tag{1}$$

其中第一行是对丙酮酸的平衡，第二行是对乙酰辅酶 A 的平衡，最后一行是对 NADH 的平衡。再次说明，署名的变量 r 已经引入以表示相应代谢物的胞外累积速率。现在利用式（8.9）的简单方法和基于式（8.12）和式（8.13）的程序对这两种情况对未测量的速率进行最小二乘估计计算。

首先从式（8.10）计算矩阵 $\mathbf{G}_c^T$ 的 Moor-penrose 拟-逆矩阵：

$$(\mathbf{G}_c^T)^{\#}=\left[\begin{pmatrix}-1&1&1\\0&-1&0\end{pmatrix}\begin{pmatrix}-1&0\\1&-1\\1&0\end{pmatrix}\right]^{-1}\begin{pmatrix}-1&1&1\\0&-1&0\end{pmatrix}=\begin{pmatrix}-0.5&0&0.5\\-0.5&-1&0.5\end{pmatrix} \tag{2}$$

然后从式(8.9)对未测量的速率进行求解：

$$\begin{pmatrix}r_c\\r_{ac}\end{pmatrix}=-\begin{pmatrix}-0.5&0&0.5\\-0.5&-1&0.5\end{pmatrix}\begin{pmatrix}1&-1&-1&0\\0&0&1&-1\\1&-1&0&-2\end{pmatrix}\begin{pmatrix}r_{Pyr}\\r_{lac}\\r_{for}\\r_{et}\end{pmatrix}=\begin{pmatrix}0&0&-0.5&1\\0&0&0.5&0\end{pmatrix}\begin{pmatrix}r_{Pyr}\\r_{lac}\\r_{for}\\r_{et}\end{pmatrix} \tag{3}$$

这个解与例 8.3 中对确定性系统所求出的解是一致的，即：如果没有测量误差，则上述解与例 8.3 中求出的解相同［尝试将由例 8.5 的式（4）所得的 r_{et}表达式代入上述式中，将求得的 r_c 和 r_{ac}的表达式与例 8.5 中的那些表达式进行比较］。由式（3）看到对未测量通量的估计与丙酮酸通量和乳酸的积累速率的测量无关。

为了改进遵从 Tsai 和 Lee（1988）的方法所得的未测量的和已测量的代谢物通量的估计，以式（8.12）所表示的形式改写式（1）为：

$$\begin{pmatrix} r_{Pyr} \\ r_{lac} \\ r_{for} \\ r_{et} \\ 0 \\ 0 \\ 0 \end{pmatrix} = \left(\begin{array}{ccc:ccc} 1 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 1 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 1 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 1 & 0 & 0 \\ \hdashline 1 & -1 & -1 & 0 & -1 & 0 \\ 0 & 0 & 1 & -1 & 1 & -1 \\ 1 & -1 & 0 & -2 & 1 & 0 \end{array}\right) \begin{pmatrix} r_{Pyr} \\ r_{lac} \\ r_{for} \\ \hdashline r_{et} \\ r_{c} \\ r_{ac} \end{pmatrix} \tag{4}$$

其中虚线表示出矩阵 **T** 的分解。注意化学反应计量矩阵 $\mathbf{G}^{T}$（最后三行）、4×4 单位矩阵和零矩阵的出现。上面的方程这样写以致 $\mathbf{v}_1$ 仅由已测定的通量组成，但这不必一定要这样。未测量的速率能与已测定的速率一起完全包含在 $\mathbf{v}_1$ 中。利用所表示的矩阵求出：

$$\mathbf{T}_r = \begin{pmatrix} 1 & 0 & 0 \\ 0 & 1 & 0 \\ 0 & 0 & 1 \\ 0 & 0 & 0 \end{pmatrix} - \begin{pmatrix} 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 \\ 1 & 0 & 0 \end{pmatrix} \begin{pmatrix} 0 & -1 & 0 \\ -1 & 1 & -1 \\ -2 & 1 & 0 \end{pmatrix}^{-1} \begin{pmatrix} 1 & -1 & -1 \\ 0 & 0 & 1 \\ 1 & -1 & 0 \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} 1 & 0 & 0 \\ 0 & 1 & 0 \\ 0 & 0 & 1 \\ 1 & -1 & -0.5 \end{pmatrix} \tag{5}$$

从而给出：

$$\hat{\mathbf{v}}_1 = \begin{pmatrix} \hat{r}_{Pyr} \\ \hat{r}_{lac} \\ \hat{r}_{for} \end{pmatrix} = \frac{1}{13} \begin{pmatrix} 9 & 4 & 2 & 4 \\ 4 & 9 & -2 & -4 \\ 2 & -2 & 12 & -2 \end{pmatrix} \begin{pmatrix} r_{Pyr} \\ r_{lac} \\ r_{for} \\ r_{et} \end{pmatrix} \tag{6}$$

和

$$\hat{\mathbf{v}}_2 = \begin{pmatrix} \hat{r}_{et} \\ \hat{r}_{c} \\ \hat{r}_{ac} \end{pmatrix} = \frac{1}{13} \begin{pmatrix} 4 & -4 & -2 & 9 \\ 3 & -3 & -8 & 10 \\ 1 & -1 & 6 & -1 \end{pmatrix} \begin{pmatrix} r_{Pyr} \\ r_{lac} \\ r_{for} \\ r_{et} \end{pmatrix} \tag{7}$$

其中方程右边的速率向量表示相应代谢物通量的测定值。还注意到这个解与例 8.3 中确定性系统的解是一致的［再尝试将由例 8.5 的式（4）中对 r_{et}的表达式代入上式，并将得到的 r_c 和 r_{ac}表达式与上述方程得出的结果相比］。然而，在这里在任何已测量速率中的测量噪声的存在会影响对已测的和未测的速率的最小二乘的最佳估计。因此，丙酮酸通量的估计是所有四个已测速率的函数。

在上述估计程序中，间接假定稳态假设完全满足并且噪声仅分布在已测量的通量中。如果在拟稳态方程中也存在噪声（意味着相应代谢物的小的积累是可能的），则式（8.12）仍然形成胞内通量估计的基础，但直接得出该解为：

$$\hat{\mathbf{v}} = (\mathbf{T}^{T}\mathbf{F}^{-1}\mathbf{T})^{-1}\mathbf{T}^{T}\mathbf{F}^{-1} \begin{pmatrix} \mathbf{v}_m \\ 0 \end{pmatrix} \tag{8.20}$$

其中，**F** 是针对已测量的通量和拟稳态假设二者的残差的方差-协方差矩阵。还有，如果噪声具有相同的数量级，则由式（8.21）所给出的最小二乘估计可以应用：

$$\hat{\mathbf{v}} = (\mathbf{T}^{T}\mathbf{T})^{-1}\mathbf{T}^{T} \begin{pmatrix} \mathbf{v}_m \\ 0 \end{pmatrix} \tag{8.21}$$

一般说来最好使用假定噪声仅分布于所测量的速率这样的程序步骤，但是由于式（8.21）的简单结构因而常常用于代谢物通量的计算。然而，人们可以利用式（8.20）并且对拟稳态假设规定非常低的方差（Vallino and Stephanopoulos，1993），因为这将给出等同于用先前描述的程序所得出的估计（见例 8.7）。

【例 8.7】 超定系统的分析

现在我们再次回到在例 8.5 和例 8.6 所处理的乳酸菌的异型发酵代谢并用式（8.20）和式（8.21）对胞内通量计算估计。首先，假定没有协方差而且在所测定的通量中的方差是相同的（任意设为 1）。拟稳态假设的方差由一个非常小的值（10^{-9}）给出，实际上相当于没有噪声。用式（8.20），得出：

$$\begin{pmatrix} \hat{r}_{\mathrm{Pyr}} \\ \hat{r}_{\mathrm{lac}} \\ \hat{r}_{\mathrm{for}} \\ \hat{r}_{\mathrm{et}} \\ \hat{r}_{\mathrm{c}} \\ \hat{r}_{\mathrm{at}} \end{pmatrix} = \frac{1}{13}\left(\begin{array}{cccc:ccc} 9 & 4 & 2 & 4 & 2 & 0 & 2 \\ 4 & 9 & -2 & -4 & -2 & 0 & -2 \\ 2 & -2 & 12 & -2 & -1 & 0 & -1 \\ 4 & -4 & -2 & 9 & -2 & 0 & -2 \\ 3 & -3 & -8 & 10 & -8 & 0 & 5 \\ 1 & -1 & 6 & -1 & -7 & -13 & 6 \end{array}\right)\begin{pmatrix} r_{\mathrm{Pyr}} \\ r_{\mathrm{lac}} \\ r_{\mathrm{for}} \\ r_{\mathrm{et}} \\ 0 \\ 0 \\ 0 \end{pmatrix} \tag{1}$$

这些估计值都等于在例 8.6 中从式(6)和式(7) 中得出的值（注意矩阵中仅仅虚线左边的元素是重要的，因为虚线右边的元素都与零向量相乘）。相反，如果直接用式（8.21），求出估计值由下式给出：

$$\begin{pmatrix} \hat{r}_{\mathrm{Pyr}} \\ \hat{r}_{\mathrm{lac}} \\ \hat{r}_{\mathrm{for}} \\ \hat{r}_{\mathrm{et}} \\ \hat{r}_{\mathrm{c}} \\ \hat{r}_{\mathrm{at}} \end{pmatrix} = \frac{1}{15}\left(\begin{array}{cccc:ccc} 11 & 4 & 2 & 4 & 2 & 0 & 2 \\ 4 & 11 & -2 & -4 & -2 & 0 & -2 \\ 2 & -2 & 14 & -2 & -1 & 0 & -1 \\ 4 & -4 & -2 & 11 & -2 & 0 & -2 \\ 3 & -3 & -9 & 12 & -9 & 0 & 6 \\ 1 & -1 & 7 & -1 & -8 & -15 & 7 \end{array}\right)\begin{pmatrix} r_{\mathrm{Pyr}} \\ r_{\mathrm{lac}} \\ r_{\mathrm{for}} \\ r_{\mathrm{et}} \\ 0 \\ 0 \\ 0 \end{pmatrix} \tag{2}$$

它非常不同于式(1)的估计。

与 4.4 节中对超定黑箱模型的分析相类似，如果所测量的速率的数目大于 $F+1$，那么就也有可能利用测量冗余度并结合代谢模型以进行误差诊断。如果假定拟稳态假设是正确的，则这种误差诊断是基于式（8.11）的简化的冗余矩阵（$\mathbf{R}_r$），如 4.4 节一样，检验函数 h 可以从下式计算：

$$h = \varepsilon^T \mathbf{P}^{-1} \varepsilon \tag{8.22}$$

其中 $\mathbf{P}$ 根据式（4.22）计算出，而 ε 是残差向量并由下式给出：

$$\varepsilon = \mathbf{R}_r \mathbf{v}_m \tag{8.23}$$

检验函数 h 与 4.4 节所述的 χ^2 分布的比较可以识别在一定置信度下的过失测量误差。通过一次消除一个测量并接着计算所产生的检验函数，就有可能识别过失测量误差的来源。如果存在着一个或多个拟稳态假设被违背的迹象，仍可以进行误差诊断以验证这些假设的一

致性。这里，式（8.12）是分析的基础，而且，除了通量测量外，拟稳态假设也可一次消除一个，每次之后计算新的冗余矩阵、新的检验函数 h ［式（8.22）］和一个对 χ^2 分布的类似比较。

根据化学反应计量学的 Gibbs 规则，在一个代谢模型中的自由度总是小于或等于在黑箱模型中的自由度（Nielse and Viladsen，1994）。因此，利用代谢模型对过失测量误差和误差诊断的识别应当是很有吸引力的，因为这种分析只需较少的测量即可。然而，对于简单代谢模型，其自由度通常与代表该系统的黑箱模型的自由度相同［在例 8.3 中的乳酸模型中有 3 个自由度，具有六种代谢物和三种元素（C、H、O），这个系统的黑箱模型的自由度也为 3］，而对于更复杂的模型，作为大的化学反应计量矩阵的结果，这种分析可能变得非常烦琐。因此，误差诊断将优先使用黑箱模型来进行，并且，可疑的测量被识别并改正之后，该组改进了的速率估计值就可用以计算代谢通量的更好的估计值。

8.3 不定系统-线性规划

如果已测量的通量的个数小于系统的自由度，则对网络通量存在无数个解。在这种情况下，倘若能够规定一个合适的目标函数（例如，使细胞比生长速率最大这样的目标函数），那么就能利用线性规划来确定胞内通量分布。用这种方法，通过优化以代谢物平衡的约束为条件的目标函数，就有可能得到胞内通量的一个惟一解。在举例说明这种方法在细胞系统研究的用途之前，我们利用一个非常简单的例子（其对线性规划问题的本质提供一个有用的洞察力）来介绍该方法的基本描述。

考虑一个具有两个变量 x 和 y 的系统，其通过如下约束所关联：

$$2x + y = 4 \tag{8.24}$$

其给定上式的解落在直线 AB 上（见图 8.6）。除了式（8.24）之外，为所有的线性规划问题所共有的另一个约束是所有的变量（此例中即 x 和 y）都需要是非负的。这就违背了我们对代谢通量的定义：其可正可负。因此，线性规划对解决代谢通量平衡的应用需要扩展通常的代谢模型，以包括该模型 J 个反应中每个反应的正向或逆向通量或至少可能是可逆的那些反应的通量。用约束条件 $x>0$、$y>0$，因此，上述问题的解被限定在（x，y）空间的正象限中。这仍表示有无数个解，通过施加让问题的解能最大化或最小化某一成本（或目标）函数这样的要求，可以将无数个解进一步减少到一个解。例如，如果想最大化上例中的目标函数 $2x+3y$，问题是要求出一个解，这个解落在直线 AB 上，而同时又能最大化该目标函数。图 8.6 显示了一族成本线。这条线能得出目标函数的最大值而同时满足由 $2x+3y=12$ 给出的约束条件。该线与直线 AB 相交于 $x=0$ 及 $y=4$。在这个例子中可以得到一个可行的解，但是人们也可遇到没有可行解或有无穷多个解的情况［在上述例子中，如果目标函数与式（8.24）相同或是它的倍数］。

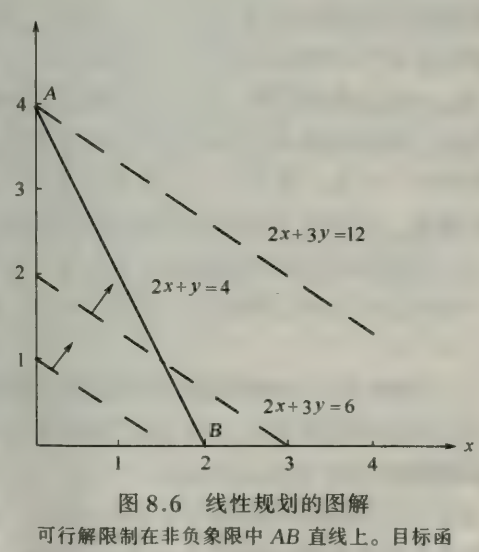


图 8.6 线性规划的图解

可行解限制在非负象限中 AB 直线上。目标函数由一组平行线组成（图中三条虚线所示）。最大化目标函数的线与直线 AB 交于点（x，y）=（0，4），该点为此最优化问题的解

现在返回到我们的代谢模型，其约束条件由式（8.7）给出。因为在线性规划公式表示中所有的变量（即通量）都必须是正的，因此我们这样改写模型以使其化学反应计量式中包含正向反应和逆向反应（在那些包含可逆向反应的情况下）。因此，该约束条件可概括为：

$$\mathbf{G}_{ex}^{T}\mathbf{v}_{ex}=0 \quad 且 \quad \mathbf{v}_{ex}\geqslant 0 \tag{8.25}$$

式中，$\mathbf{G}_{ex}^{T}$是修改过的化学反应计量矩阵以包含正向和逆向反应的反应计量式，而 $\mathbf{v}_{ex}$是相应修改后的通量向量，维数为 J_{ex}。在上述简单例子中，该约束确定了二维空间中的一条直线。具有 J_{ex}个变量（或通量），则每个约束是 J_{ex}维空间中的一个超平面。因为必须满足所有的约束，式（8.25）确定一个解必须落在这个 J_{ex}维空间中 K 个超平面的交集上。如果有一个超平面不与其它超平面相交，则对于这个通量的可行解不存在（也就是说在这种情况下这组可行的解都是空的）。然而，这种情况在实际中很少遇到。下一步是要确定一个目标函数，其是这些通量的线性函数，即向量 $\mathbf{v}_{ex}$的元素的函数。通过求解相应的最大化或最小化问题，即可求得最优解。

$$\min(\mathbf{a}\mathbf{v}_{ex}) \text{ 或 } \max(\mathbf{a}\mathbf{v}_{ex})\text{，服从式（8.25）的约束} \tag{8.26}$$

上式表示对 $\mathbf{a}\mathbf{v}_{ex}$求最小值或最大值，其中，$\mathbf{a}$ 是包含各个单个变量权重的行向量，这些单个变量表示各个单个通量对目标函数的影响。

求式（8.26）问题的最优解可能是很复杂的，因为潜在的大量可行解满足所有约束。然而，正如上述简单的例子一样，最优解位于一组可行解的末端（或角上，约束和目标函数二者线性的结果）。因此，通过首先列举出所有解角（solution corners），然后在可行解空间的每一点评价该目标函数，则会（在原理上）找到最优解。但是由于解角的数目非常大，这个方法实际上是不可行的。替代地，应用所谓单纯形法（Dantzig，1963），其是为解决约束线性优化问题精选的方法（Gyr，1978）。这种方法应用如下：首先，确定可行组的一个角，然后沿着可行解的边缘从一个角到另一个角继续进行。在一个给定的角，有几条边缘可供选择，一些引离最优解，其它的逐渐引向最优解。在单纯形法中，沿着确保目标函数减小（或增加）的边缘移动。这条边导向具有更低（或更高）数值的一个新的角，且没有可能性返回到任何一个角，其产生一个更高（或更低）的目标函数值。最终，可以达到一个特定的角，从该角，所有的边都导致更高的目标函数值，而且，这个角就代表最优解。尽管它的简单描述，这种单纯形法执行起来相当复杂，但是已开发出强健的算法［Gyr（1978）］，而且在几个软件包中是可以得到的，例如 Mathematica 和 Matlab。

【例 8.8】 大肠杆菌代谢的化学计量解释

对几种代谢模型，利用线性规划已经得到其最优通量分布。在这个例子中将考虑大肠杆菌代谢的分析（Varma et al，1993a，b）。基于 *E.coli* 代谢的详细化学计量模型，他们分析了这个微生物的葡萄糖分解代谢和生物化学的生产能力。他们的模型由 107 个代谢物（包括底物和代谢产物）和 95 个可逆反应组成，而且因为每个反应都被包含正和逆两个方向，这就产生一个 107×190 的化学计量矩阵，即有 83 个自由度。没有一个通量被测量，但用了一个通量（葡萄糖比吸收速率）来度量这些通量值，以使它们的单位均为 $mmol \cdot g^{-1}$(干重)$\cdot h^{-1}$。用于通量计算的仅有的实验数据如下：

- 菌体生长的代谢需求被用来计算生物量合成所消耗的代谢物量。事实上，代谢物的消耗量是作为导致生物量合成的一个反应中的计量系数而被包括的。

●用于维持 ATP 的需求。通过不同比生长速率下葡萄糖的比吸收速率对实验数据的拟合，分别估算出对与生长相关及与生长无关的维持需求量是 $23mmol \cdot g^{-1}$(干重)·h^{-1}和 $5.87mmol \cdot g^{-1}$(干重)·h^{-1}，这些值被用于计算中。

●氧的最大比吸收速率为 $20mmol \cdot g^{-1}$(干重)·h^{-1}。

目标函数是比生长速率最大。因此，如果葡萄糖比吸收速率已经给出，那么该模型就决定着相应的最大比生长速率以及网络中的所有通量。所选择的网络通量可以对相应的比生长速率作图，如图 8.7 所示。从中看到，在葡萄糖比吸收速率比较低时（相应于低的比生长速率），没有副产物生成，即，处于完全呼吸。结果，在这个范围氧的比吸收速率随比生长速率线性增加（3.4 节）。当葡萄糖比吸收速率达到 $8mmol \cdot g^{-1}$(干重)·h^{-1}时(相应的比生长速率为 $0.9h^{-1}$)，从葡萄糖完全氧化为 CO_2 的氧需求量超过规定的最大值 $20mmol \cdot g^{-1}$(干重)·h^{-1}。因此，细胞转换到呼吸和发酵同时进行的混合代谢。所分泌的第一个发酵代谢物是乙酸，而在更高的糖酵解通量（或更高的比生长速率）下，也分泌甲酸。最后，在非常高的糖酵解通量下，乙醇也被分泌了。有趣的是，这个模型预测了代谢物分泌的正确次序，即，首先是乙酸，然后是甲酸，最后是乙醇，其与实验结果一致。Vama 等(1993a) 将之解释为乙酸所含的能量较低的结果（乙酸氧化的 ATP 得率低于甲酸和乙醇氧化的 ATP 得率)。

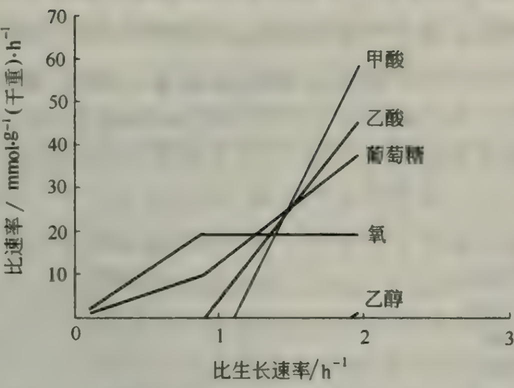


图 8.7 葡萄糖和氧的比吸收速率和乙酸、甲酸、乙醇的比生成速率与比生长速率的函数关系

比生长速率是利用线性规划通过 *E.coli* 代谢模型的比生长速率最大化而计算出的

对于氧的最大比吸收速率低于 $20mmol \cdot g^{-1}$(干重)·h^{-1}（其可能是生物反应器供氧限制的结果）的情况下，计算了临界糖酵解通量（或比生长速率）。结果发现这些通量值与对细胞的氧供给之间是一种线性关系。

线性规划的优点是通过计算目标函数 Z 相应于系统变量的敏感度就能够获得更多的信息。这些敏感度被称之为影子价格（shadow prices），对 *E.coli* 代谢模型，其由下式给出：

$$\lambda_i = \frac{\partial \mu}{\partial r_i}$$

式中，r_i 是第 i 个化合物（例如氧、乙酸或者一种氨基酸）的净比消耗速率。因此，影子价格反映了代谢速率的变化对比生长速率的影响。表 8.2 给出了对不同的氧比吸收速率(r_o) 下由代谢模型计算的一些影子价格。当 r_o 较低时，对氧的影子价格为正，即，提高 r_o 会使比生长速率增加。当 r_o 达最大值时，提高 r_o 不能使比生长速率进一步增加，因此影子价格为零。在厌氧条件下($r_o=0$)，NADH 的影子价格为负，这是由于不能氧化这个辅助因子，即，如果 NADH 的产量增加，则比生长速率将下降。这表明在厌氧条件下辅助因子再生可以限制生长。对于 ATP，发现在厌氧条件下影子价格是高的，并且随 r_o 的增加而减小。因此，与厌氧生长相比，ATP 对生长的供给对细胞好氧生长变得不太限制了。所有这些代谢物的影子价格都随着 r_o 的增加而增加，因为在好氧条件下这些化合物能被细胞氧化并提供菌体生长所需的额外 ATP。有趣地注意到，在厌氧条件中，琥珀酸的影子价格高

于其它代谢物。该化合物的氧化将导致增加 NADH 的生产（在这些条件下细胞再氧化它有困难），但是很可能的是，对于前体代谢物的供应，该化合物可能是很有价值的。

表 8.2　利用 Varma 等（1993a）描述的代谢模型计算的不同的氧比吸收速率 [$mmol \cdot g^{-1}$(干重)$\cdot h^{-1}$] 下的影子价格

代谢物	影子价格/[g(干重)·$mmol^{-1}$(代谢物)]		
	0	12	20
氧	0.0399	0.0282	0
ATP	0.0109	0.0106	0.0049
NADH	−0.0054	0	0.0065
乙酸	0	0	0.0242
乙醇	0	0.0106	0.0422
乳酸	0.0054	0.0106	0.0422
琥珀酸	0.0109	0.0177	0.0504

注：葡萄糖比吸收速率为 10$mmol \cdot g^{-1}$(干重)$\cdot h^{-1}$。

这个模型也允许计算通过不同途径的通量。这里还发现，在厌氧条件下，通过 PP 途径氧化分支的通量为零，即 6-磷酸葡萄糖脱氢酶是没有活性的，而生物合成所需的 NADPH 由一个转氢酶反应提供。对于高的氧比吸收速率，大约 60% 的 6-磷酸葡萄糖经 PP-路线代谢，而且转氢酶没有活性。

这个模型也用来研究 *E.coli* 生产其它代谢物如各种氨基酸的潜力（Varma et al, 1993b）。这个潜力的大小可以通过相应的影子价格的大小来确定，因为后者为菌体生长与特定代谢物（如氨基酸）生产之间的权衡提供了一个度量标准，结果发现，对甘氨酸、丙氨酸和天冬氨酸等生物合成路线简单的氨基酸，其影子价格比较低；而对芳香族氨基酸如苯丙氨酸、色氨酸、酪氨酸等生物合成路线复杂的氨基酸，其影子价格较高。因此，如果细胞打算通过一条长而复杂的生物合成路线生产一种产物，则细胞代谢的需求就大，而且对菌体生长的影响是严重的。相反，一个具有简单代谢路线的化合物能以很低的成本由细胞生产，而且对菌体生长的影响因而也很小。

8.4　敏感性分析

在前一节，已经推导出确定性系统、超定系统和不定系统的质量平衡方程的解。尽管在每种情况下都获得一个惟一解，但是相应于测量中的小干扰，度量解的敏感性或“脆弱性”是很重要的。在敏感性分析中的第一步是检验这个系统是否是很好形成的（well-posed），即检验是否化学计量矩阵是状态良好的（well-conditioned）。对一个病态（ill-conditioned）化学计量矩阵，即使测量中的很小变化也可能对通量计算有非常大的影响。为了对其举例说明，我们考虑两个方程系统：

$$\begin{pmatrix} 1 & 1 \\ 1 & 1.0001 \end{pmatrix}\begin{pmatrix} v_1 \\ v_2 \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} 2 \\ 2 \end{pmatrix} \quad 和 \quad \begin{pmatrix} 1 & 1 \\ 1 & 1.0001 \end{pmatrix}\begin{pmatrix} v_1 \\ v_2 \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} 2 \\ 2.0001 \end{pmatrix} \tag{8.27}$$

尽管等式右边差别仅为很小的一个数 0.0001，但该解从 $v_1 = 2$ 和 $v_2 = 0$ 变化为 $v_1 = v_2 = 1$。因为解一般都是使用数值法得出的，如果化学计量矩阵是病态的，那么由计算上小的舍入误差所引起的通量估计中的误差就可能被放大。一个矩阵敏感性的度量被称做条件数（*condition number*），其由式（8.28）给出：

$$C(\mathbf{G}^T) = \|\mathbf{G}^T\| \, \|(\mathbf{G}^T)^{\#}\| \tag{8.28}$$

式中，$\|\ \|$表示任何矩阵的范数；$(\mathbf{G}^T)^{\#}$表示化学计量矩阵的拟-逆矩阵（见8.2节）。条件数的计算是相当复杂的（见方框8.1），但实际上，可利用商业软件包如Matlab、Mathematica或Maple求得。对于具有正特征值的对称矩阵，条件数等于特征值的最大值和最小值之比，因此条件数总是大于1（这对非对称矩阵也是成立的），而且大的条件数象征一个病态矩阵❶。因此，对于式（8.27）的矩阵，它是对称矩阵，特征值为2与$10^{-4}/2$，条件数为10^4。条件数的大小对所测量通量精度的要求将提供重要信息，这是由于测量必须以一定精度来进行，而精度所带有的数字的位数与条件数中的位数相同。因此，在上例中，条件数有五位数字，通量必须精确地测量到五位数字。因为发酵速率很少能精确到2位数以上来量化（例如，微生物的比生长速率能被表示为$0.37h^{-1}$，其具有很好的精度），因此对一个状态良好的化学计量矩阵的要求是条件数处于1～100之间。这对大多数代谢模型都能实现。因此，Vallino和Stephanopoulos（1993）的模型的条件数为62，Nissen等（1997）的模型的条件数为22。如果条件数大于100，则说明此化学计量矩阵是病态的。就有必要改变这个模型建立中所用的生物化学。应当注意的是，在计算条件数时不需要进行测量，因此，代谢模型能在进行任何计算之前进行检验。

方框8.1　条件数的计算

式（8.28）已给出了条件数的一般定义。然而，要利用这个方程，必须计算矩阵的范数。在此简要描述如何进行该过程。对更多细节，请参见线性代数教科书。

一个矩阵的范数是任何矢量$\mathbf{x}$通过矩阵相乘而被扩大的最大程度：

$$\|\mathbf{G}^T\| = \max \frac{\|\mathbf{G}^T\mathbf{x}\|}{\|\mathbf{x}\|} \tag{1}$$

而且可以表明它等于矩阵$\mathbf{GG}^T$的最大特征值的平方根：

$$\|\mathbf{G}^T\| = \sqrt{\lambda_{max}(\mathbf{GG}^T)} \tag{2}$$

因此，求矩阵的范数的问题相当于一个特征值问题，而且通过矩阵$\mathbf{GG}^T$的特征值和拟-逆矩阵（$\mathbf{G}^T$）的相似矩阵的特征值［由$(\mathbf{GG}^T)^{-1}\mathbf{G}$给出］，就可以利用式（8.28）计算条件数。但是求特征值一般比较费时间，因此在计算机算法中利用不同的方法。矩阵$\mathbf{GG}^T$的特征值平方根等于矩阵$\mathbf{G}^T$的所谓的奇异值，它可以通过奇异值分解很容易得到，而奇异值分解计算过程可以利用计算机软件包来迅速完成。这样，就能得到矩阵$\mathbf{G}^T$及其拟-逆矩阵（$\mathbf{G}^T$）的最大奇异值，然后两值相乘。

前已讨论，条件数计算应当总是代谢模型敏感性分析的第一步。然而，这并没有给相应于所测量的通量中的变化的计算的敏感性提供任何信息。这些信息是由解矩阵的元素所提供的，在确定性系统中，有：

$$\frac{\partial \mathbf{v}_c}{\partial \mathbf{v}_m} = -(\mathbf{G}_c^T)^{-1}\mathbf{G}_m^T \tag{8.29}$$

在式（8.29）中，第j行和第i列的元素说明了在相应于第i个通量测量中第j个通量（它是计算出的）的敏感性。因此，解矩阵的元素提供了有关系统敏感性的信息。

---

❶ 根据条件数的这种定义，在一组线性代数式中病态矩阵与一个耦合的一阶微分方程刚性系统之间存在一个直接的类似，后者为许多化学工程师所熟知。

参 考 文 献

Aiba, S. & Matsuoka, M. (1979). Identification of metabolic model: Citrate production from glucose by *Candida lipolytica*. *Biotechnology and Bioengineering*. **21**, 1373-1386.

Dantzig, G. B. (1963). Linear programming and extensions. Princeton: Princeton University Press.

Gyr, M. (1978). Linear optimization using the simplex algorithm (simple). CERN Computer Center Program Library, CERN, Geneva, Switzerland.

Madron, F., Veverka, V. & Vanecek, V. (1977). Statistical analysis of material balance of a chemical reactor. *AIChE Journal*. **23**, 482-486.

Nielsen, J. (1997). *Physiological Engineering Aspects of Penicillium chrysogenum*. Singapore: World Scientific.

Nielsen, J. & Villadsen, J. (1994). *Bioreaction Engineering Principles*. New York: Plenum Press.

Nissen, T. L., Schulze, U., Nielsen, J. & Villadsen. J. (1997). Flux distributions in anaerobic, glucose-limited continuous cultures of *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology* **143**, 203-218.

Reardon, K. F., Scheper, T. H. & Bailey, J. E. (1987). Metabolic pathway rates and culture fluorescence in batch fermentations of *Clostridium acetobutylicum*. *Biotechnology Progress* **3**, 153-167.

Stephanopoulos, G. & Vallino, J. J. (1991). Network rigidity and metabolic engineering in metabolite overproduction. *Science* **252**, 1675-1681.

Theobald, U., Mailinger, W., Baltes, M., Rizzi, M. & Reuss, M. (1997). In vivo analysis of metabolic dynamics in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnology and Bioengineering*. **55**, 303-316.

Tsai, S. P. & Lee, Y. H. (1988). Application of metabolic pathway stoichiometry to statistical analysis of bioreactor measurement data. *Biotechnology and Bioengineering* **32**, 713-715.

Vallino, J. J. & Stephanopoulos, G. (1993). Metabolic flux distributions in *Corynebacterium glutamicum* during growth and lysine overproduction. *Biotechnology and Bioengineering* **41**, 633-646.

Varma, A., Boesch, B. W. & Palsson, B. O. (1993a). Stoichiometric interpretation of *Escherichia coli* glucose catabolism under various oxygenation rates. *Applied and Environmental Microbiology* **59**, 2465-2473.

Varma, A., Boesch, B. W. & Palsson, B. O. (1993b). Biochemical production capabilities of *Escherichia coli*. *Biotechnology and Bioengineering* **42**, 59-73.

第 9 章　利用同位素标记实验测定代谢通量的方法

在前面一章，提出了通过胞内代谢物浓度的测量来确定胞内代谢通量的一般方法学，并提出了证明该实践合理性的几个理由。显然，胞内通量在建立一个生物系统的生理状态方面是非常有价值的。正如后面几章将要描述的一样，代谢通量也起着另一个重要作用，即：它们为代谢网络的控制结构提供一幅综合的画卷。本书也将说明代谢控制系数，其已被建议作为代谢网络中所施加的控制程度的度量标准，可直接根据代谢通量的大小及随代谢扰动的引入而产生的通量变化来确定。在这方面，精确测定胞内通量的方法就变得极为重要，这是由于它们可以直接得出对代谢网络中通量控制的解释。

正如前一章所讨论的，测定胞内通量所要求的主要输入是胞外代谢物的通量，也就是底物吸收速率和产品分泌速率。这些速率可以从稳态恒化实验最好地获得，因为在恒化实验中，所有代谢物的浓度都是在稳态下测定的。相应的吸收/分泌速率则可通过代谢物浓度乘以恒化器稀释速率来计算。由于恒化实验持续时间很长，因此，往往采用批式实验来测定通量。微生物的分批培养可在相对短的时间内获得大量数据。然而，由于胞外代谢物速率的确定要求计算相应浓度对时间的微分，该运算常常引入大的误差，因此，这种速率的确定是相当复杂的。此外，分批培养实验期间生理稳态的缺乏也会使分批培养数据的解释复杂化。

无论是采用恒化实验，还是采用分批培养实验，应该牢记的是，仅仅采用胞外代谢物的浓度测量结果来阐明代谢网络的程度是有限的。这样的测量至多提供代谢网络中少数分支点上碳通量分布的信息。这一点可能会由于建立代谢网络方程式的复杂性而使人难以理解。本书提供了几个例子（见第 12 章）来说明将相当复杂的多组生化反应简化为简单的网络等价表示。特别地，胞外代谢物浓度测量在阐明代谢网络的特征方面具有有限的潜力，例如汇合于网络另一点的分叉点上的通量分布、代谢循环以及阐明网络结构达较高的生化分辨率等。这些情况在图 9.1 中进行了说明，图 9.1 表示主要化合物 A 在两条竞争途径（净速率分别为 v_1 和 v_2）之间的分流。A 的消耗速率以及 F、G 的分泌速率的测定足以确定分支点 D、H 的通量分布，并独立计算分泌的另一代谢物 K。然而，代谢物 A 在途径 1 和途径 2 之间的通量分配比，或者说，经过循环 A→B→C→A 的通量是无法确定的。同样地，如果更多的反应包含于 C 至 2D 的转化中，则必须把它们全部归并为一个单一反应。如果需要有关途径 1 和途径 2 之间的分配比的更多信息，或所述步骤的较高的生化分辨率的更多信息，则必须采用不同的方法。

本章将要叙述的一类方法是使用在特定碳位用^{13}C 或^{14}C 标记化合物。通过使用这样的化合物，那些在中间代谢物的碳原子分布上引入不对称性的途径就可以与另一途径区别开来，即使它们导致相同终产物的形成。该不对称性导致在一个或多个代谢物中具有根本不同的

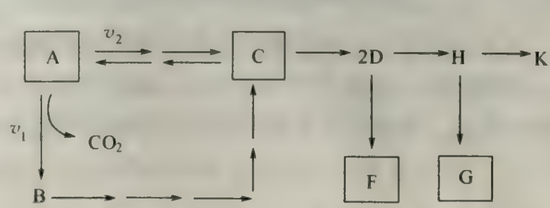


图 9.1　代谢网络通量分流示意

代谢网络按第 8 章所述的胞外代谢物(框内)平衡方法部分分解

标记富集模式，这些代谢物的测量可为竞争性反应的速率确定提供必要的信息。^{13}C 或 ^{14}C 标记的化合物用于联系胞外或胞内代谢物中标记富集度的测量。此外，应用这样的方法所获得的信息种类极大地依赖于所用的标记底物的种类、所标记的特定碳原子以及富集度已测的特定代谢物（胞内或胞外）。由于情况通常是决定要采用的标记碳底物和要测量的特定化合物仅仅是基于对它们的熟悉和经验，而很少考虑可从标记底物与具体代谢物测量的特定组合中获取信息的种类，因此，这是非常重要的一点。

本章将提出通过使用标记化合物来确定胞内代谢通量的方法。虽然该基本思想贯穿全章，但仍将可能的方法分为三类，这主要是依据要分析的网络的大小和复杂程度。在第一种情况中，提出适用于代谢物可直接测定，或总是服从解析解的简单网络情况的方法（9.1 节）。对于含有循环的代谢网络，直接计算标记转移是不适当的。另一方法是在列举所有可能的代谢物同位素标记化合物的基础上进行选择的方法（9.2 节）。除了有利于准确确定特定代谢物的标记富集度外，同位素标记化合物列举也允许通过气相色谱-质谱仪（GC-MS）对可测量的特定代谢物的分子量分布进行估计。由于分子量分布取决于代谢通量，因此，与 ^{13}C-核磁共振波谱法联用的 GC-MS 是有关细胞内代谢通量的另一个有价值的信息源。关于代谢物同位素标记化合物的最后一点是，这样的同位素标记化合物在确定相应代谢物的 NMR 波谱的精细结构方面所起的作用。将可看出，NMR 波谱的精细结构取决于相应同位素标记化合物的相对数量；而且，它与细胞内导致这样的同位素标记化合物形成的反应速率直接有关。最后，对于大网络的复杂情况，数值解是需要的。关于这种情况，9.3 节介绍的原子作图矩阵的概念为有效地进行标记分布计算提供了一个便利的框架，特别是当需要迭代步骤时。为了保证通过采用核磁共振（NMR）波谱法可能得到的大量测量的一致性，这种网络分析将包含相当多的反复迭代。这些计算可通过采用原子作图矩阵而简化。

9.1 根据标记富集度分数直接确定通量

该类方法依赖于为了代谢通量的直接测定而仔细选择的一个代谢物的标记强度（或富集度）的测量。所介绍的两种基本方法要求瞬时强度测量或稳态强度测量。

9.1.1 根据瞬时强度测量确定代谢通量

放射性标记化合物的瞬时强度测量可以用来直接探测特定的代谢途径，这就要求标记化合物通过细胞膜进行运输，而且其强度是作为时间的函数来测量。由于其放射性测量的专一性和高精度，该方法能适用于通过物质平衡技术不能观测的小数量级的代谢通量的确定。另一方面，它也要求专用设备来分离和测量被放射性污染的化合物。

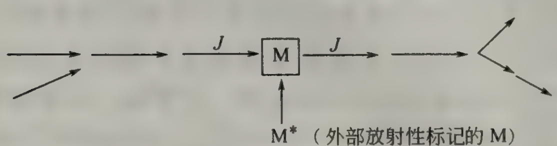


图 9.2 用于直接测定代谢通量的放射性标记代谢物示意

该方法在图 9.2 中说明，它表示的图式代谢途径涉及代谢物 M 以等于途径通量 J 的速率被合成和消耗。通量 J 可以通过引入放射性标记 M(M^*)的一个脉冲并测量纯化 M^* 样品的放射性来确定。通过假设实验期间处于代谢稳定状态，细胞内放射性标记 M 的库将按下式变化：

$$\frac{dM^*}{dt} = -\left(\frac{M^*}{M}\right)J \tag{9.1}$$

常数为 J 和 M（由于代谢稳态），积分给出

$$\ln\left(\frac{M^*(t)}{M^*(0)}\right) = -\frac{J}{M}t \tag{9.2}$$

式（9.2）表明，未知的通量 J 可以根据放射性计数的半对数图和 M 的总细胞内浓度来确定。应该注意的是，代谢稳态是必要的，但仅对于标记实验期间内。由于这样的实验持续时间较短，因此，他们可以在取自大容器的小样品上重复进行，以便确定在瞬态期间的代谢通量。当然，只有当标记测量和实际实验的时间尺度相差很大而能充分分开，而且确保标记测量期间实际的环境条件扰动最小，这才是可能的。为此，作为胞内代谢物库的函数的脉冲大小应仔细选择。

9.1.2 代谢稳态和同位素稳态实验

图 9.3 描绘了将标记化合物用于确定细胞内代谢通量的另一种方法。该图表示对应于图 9.1 中网络的标记分布示意图。如果代谢物 A 是一个六碳化合物，其第 1 个碳原子被标记，则假定形成代谢物 B 的反应是一个除去标记碳的脱羧反应，那么，经过代谢物 B 的途径将产生代谢物 C 的一个未标记分子，同时，经直接途径（速率为 v_2）产生的 C 分子将按图中所示位置 1 保留标记碳原子。标记分子中代谢物 C 的富集将直接正比于反应速率 2，反应速率 2 与代谢物 A 的总消耗速率有关。对于代谢物 D，特别是分泌代谢物 F 来说，也是如此。代谢物 F 可通过对胞外的培养基分析来测定。已发现代谢物 F 第 1 位点上的 ^{13}C 富集可提供有关相对反应速率 2 的信息，相对反应速率 2 可用于与总代谢通量的联结，以区别速率 v_1 和 v_2。

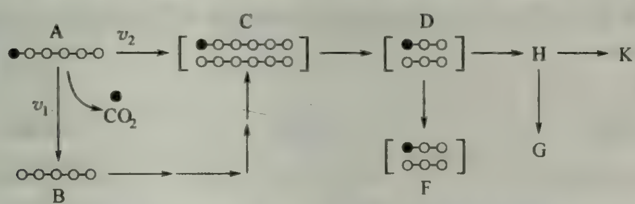


图 9.3 借助同位素标记化合物，确定分叉代谢途径的通量分配比简图
（标记的碳原子用圆点表示）

本章将通过两个例子来说明这些方法的细节。在此之前，应注意重要的两点。第一点是该方法仅在代谢稳态和同位素稳态下才有效。代谢稳态就是这样的状态，即在此状态下，所有参与代谢网络的胞内代谢物浓度都是恒定的。而在同位素稳态下，代谢物同位素标记化合物的相对群体也是恒定的。在代谢或同位素瞬态期间，胞内代谢通量的确定显然是更复杂的，它需要广泛的体内动力学信息。由于这样的信息是得不到的，因此，为了达到稳态而以这样的方法来设计实验是绝对必要的。这是应该注意的第二点。显然，稳态恒化器是进行实验的优先系统。然而，将标记底物引入系统的方式也存在着某些限制。一种方法就是通过有限脉冲方式，其浓度使进料中的底物浓度不会改变。而且其持续时间具有足够的长度使同位素稳态可以达到。实例提供了一些检测点，它们有助于评价令人满意的稳态是否已经达到。也可注意到，根据竞争途径之间产生不对称性的具体机理，图 9.3 所描绘的简单方式也会有一些变化。除了所标记 CO_2 的脱羧作用之外，差向异构酶、异构酶及其它反应也可产生所要求的不对称性。

【例 9.1】 赖氨酸生物合成中支路途径通量的确定

该实例说明使用标记丙酮酸来区别赖氨酸合成途径的最终支路中两条竞争途径。如图 9.4 所示，赖氨酸生物合成的最后步骤包括四氢吡啶二羧酸（H4D）至消旋-α,ε-二氨基庚二酸（*meso*-DAP）的转化。该转化既可以通过一条四反应步骤途径进行，也可通过由 *meso*-DAP 脱氢酶（DDH）催化的单一反应步骤进行。*meso*-DAP 脱羧后形成赖氨酸。仅依靠赖氨酸的合

成速率不能区别这两条途径，这两条途径的总通量等于赖氨酸分泌的总速率。然而，通过使用标记丙酮酸，可以估计转化为赖氨酸的每条途径的通量分数。

H4D 由草酰乙酸（OAA）和丙酮酸（Pyr）通过缩合反应生成。在 H4D 通过单步途径（图 9.4 的左边支路）转化为赖氨酸的过程中，碳原子的排列保持不变。另一方面，四步途径的最后一步反应是差向异构酶反应，它导致两种 *meso*-DAP 分子的形成，并进一步形成赖氨酸，两种 *meso*-DAP 分子互为镜像，这可通过使用标记碳原子区别出来。正是该最后步骤在 H4D 转变为赖氨酸过程中引入了不对称性，因此，它为区分赖氨酸合成的四步途径和一步途径(或支路)提供了依据。

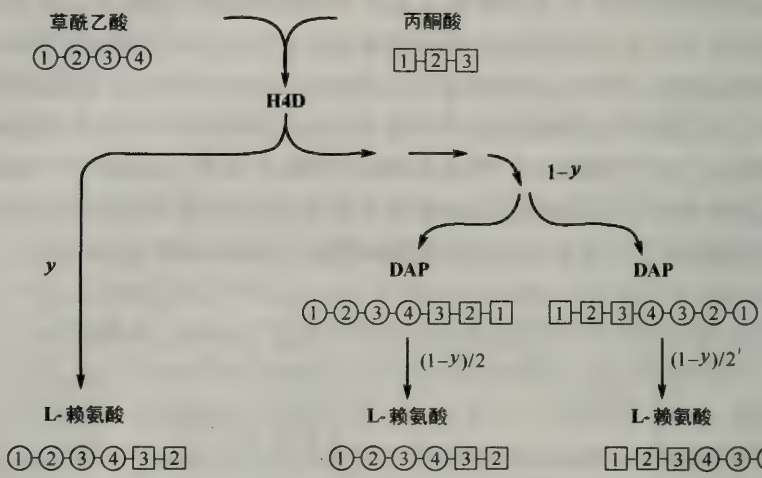


图 9.4　丙酮酸和草酰乙酸通过两条途径形成的赖氨酸标记模式

通量 $(1-y)v_{\text{lysine}}$（下标 lysine 表示赖氨酸——译者注）的四步骤琥珀酰酶途径包括酶序列：*N*-琥珀酰-2,6-酮庚二酸合成酶；*N*-琥珀酰氨基酮庚二酸-谷氨酸转氨酸；*N*-琥珀酸二氨基庚二酸脱琥珀酰酶及二氨基庚二酸差向异构酶。通量 yv_{lysine}的单步途径包含 *meso*-DAP 脱氢酶的作用，O 和 P 的下标表示原来的碳位

使用标记第 3 位碳原子的丙酮酸（$[3\text{-}^{13}C]$ 丙酮酸）作为碳源也会产生某些碳原子带有^{13}C 标记的草酰乙酸分子。在本分析中，所关注的是图 9.4 中化合物第 3 和第 5 位碳原子所带的标记，并用［$\%OAA_3$］和［$\%Pyr_3$］分别表示草酰乙酸库和丙酮酸库的分数。草酰乙酸（OAA）和丙酮酸（Pyr）都标记了第 3 位碳原子。应注意的是，这些分数也可包括标记了其它碳位置的 OAA 和 Pyr，只要 OAA 和 Pyr 的第 3 位碳原子上带有^{13}C 标记。在代谢稳态下，没有胞内代谢物的积累，则对图 9.4 的途径通量得出下列等式：

$$v_{\text{condensation}} = v_{\text{single step}} + v_{\text{four step}} = v_{\text{lysine}} \tag{1}$$

式中，下标 condensation 表示缩合；single step 表示单步；four step 表示四步。

现在推导有关 H4D 的不同同位素标记化合物库的方程。缩写如下：$H4D_{3,\text{only}}$，仅第 3 位碳原子被标记的同位素标记化合物；$H4D_{5,\text{only}}$，仅第 5 位碳原子被标记的同位素标记化合物；$H4D_{35}$，第 3、5 位碳原子都被标记的同位素标记化合物；（$H4D_3 = H4D_{3,\text{only}} + H4D_{35}$），第 3 位碳原子被标记的 H4D 同位素标记化合物的总库；（$H4D_5 = H4D_{5,\text{only}} + H4D_{35}$），第 5 位碳原子被标记的同位素标记化合物的总库。关于其中一种同位素标记化合物（如 $H4D_3$）库的平衡，可以写为：

$$\frac{dc_{\text{H4D},3}}{dt} = v_{\text{condensation}}[\%OAA_3](1-[\%Pyr_3]) + v_{\text{condensation}}[\%OAA_3][\%Pyr_3]$$

$$-(v_{\text{single step}}+v_{\text{four step}})[\%\mathrm{H4D_3}]$$

$$=v_{\text{lysine}}[\%\mathrm{OAA_3}]-v_{\text{lysine}}[\%\mathrm{H4D_3}] \tag{2}$$

式（2）中的前两项分别表示 $\mathrm{H4D_{3,only}}$和 $\mathrm{H4D_{35}}$同位素标记化合物的合成速率，第 3 项为 $\mathrm{H4D_3}$通过图 9.4 中两条途径的消耗速率。在同位素稳态下，上式的导数等于零，则得 $\mathrm{H4D_3}$ 库的表达式为：

$$[\%\mathrm{H4D_3}]=[\%\mathrm{OAA_3}] \tag{3}$$

同样可得 H4D 的其它同位素标记化合物库，并按下列等式给出：

$$[\%\mathrm{H4D_5}]=[\%\mathrm{Pyr_3}] \tag{4}$$

$$[\%\mathrm{H4D_{35}}]=[\%\mathrm{OAA_3}][\%\mathrm{Pyr_3}] \tag{5}$$

$$[\%\mathrm{H4D_{3,only}}]=[\%\mathrm{OAA_3}](1-[\%\mathrm{Pyr_3}]) \tag{6}$$

$$[\%\mathrm{H4D_{5,only}}]=[\%\mathrm{Pyr_3}](1-[\%\mathrm{OAA_3}]) \tag{7}$$

$$[\%\mathrm{H4D_{unlabeled}}]=(1-[\%\mathrm{Pyr_3}])(1-[\%\mathrm{OAA_3}]) \tag{8}$$

式中，下标 unlabeled 表示未标记。

前面的 H4D 同位素标记化合物将产生第 3 和（或）第 5 位碳原子标记的赖氨酸同位素标记化合物。假设经单步途径合成赖氨酸的通量分数为 y，即：$v_{\text{single step}}=yv_{\text{lysine}}$，则从所指 H4D 同位素标记化合物前体产生各种赖氨酸同位素标记化合物的速率如下：

从 $\mathrm{H4D_{35}}$产生 $\mathrm{L_{35}}$：$v_{\text{lysine}}[\%\mathrm{OAA_3}][\%\mathrm{Pyr_3}] \quad (9)$

从 $\mathrm{H4D_{3,only}}$产生 $\mathrm{L_{3,only}}$：$v_{\text{single step}}[\%\mathrm{H4D_{3,only}}]+(v_{\text{four step}}/2)[\%\mathrm{H4D_{3,only}}]$

$$=v_{\text{lysine}}[(1+y)/2][\%\mathrm{OAA_3}](1-[\%\mathrm{Pyr_3}]) \tag{10}$$

从 $\mathrm{H4D_{5,only}}$产生 $\mathrm{L_{3,only}}$：$(v_{\text{four step}}/2)[\%\mathrm{H4D_{5,only}}]$

$$=v_{\text{lysine}}[(1-y)/2][\%\mathrm{Pyr_3}](1-[\%\mathrm{OAA_3}]) \tag{11}$$

从 $\mathrm{H4D_{3,only}}$产生 $\mathrm{L_{5,only}}$：$(v_{\text{four step}}/2)[\%\mathrm{H4D_{3,only}}]$

$$=v_{\text{lysine}}[(1-y)/2][\%\mathrm{OAA_3}](1-[\%\mathrm{Pyr_3}]) \tag{12}$$

从 $\mathrm{H4D_{5,only}}$产生 $\mathrm{L_{5,only}}$：$v_{\text{single step}}[\%\mathrm{H4D_{5,only}}]+(v_{\text{four step}}/2)[\%\mathrm{H4D_{5,only}}]$

$$=v_{\text{lysine}}[(1+y)/2][\%\mathrm{Pyr_3}](1-[\%\mathrm{OAA_3}]) \tag{13}$$

对于稳态恒化器，可运用式（9）～式(13)，将所有第 3 位碳原子带有 $^{13}\mathrm{C}$ 标记的赖氨酸同位素标记化合物（$\mathrm{L_3}$）的总量平衡写成如下形式：

$$\frac{\mathrm{d}c_{\mathrm{L},3}}{\mathrm{d}t}=v_{\text{lysine}}\{[\%\mathrm{OAA_3}][\%\mathrm{Pyr_3}]+[(1+y)/2][\%\mathrm{OAA_3}](1-[\%\mathrm{Pyr_3}])$$

$$+[(1-y)/2][\%\mathrm{Pyr_3}](1-[\%\mathrm{OAA_3}])\}-Dc_{\mathrm{L},3}=0 \tag{14}$$

同样地，对于所有第 5 位带有 $^{13}\mathrm{C}$ 的赖氨酸同位素标记化合物（$\mathrm{L_5}$）的总量平衡则有：

$$\frac{\mathrm{d}c_{\mathrm{L},5}}{\mathrm{d}t}=v_{\text{lysine}}\{[\%\mathrm{OAA_3}][\%\mathrm{Pyr_3}]+[(1-y)/2][\%\mathrm{OAA_3}](1-[\%\mathrm{Pyr_3}])$$

$$+[(1+y)/2][\%\mathrm{Pyr_3}](1-[\%\mathrm{OAA_3}])\}-Dc_{\mathrm{L},5}=0 \tag{15}$$

式中，D 为恒化器稀释速率。式（14）和式（15）可与总赖氨酸的稳态平衡式（16）相结合以消除测量 OAA 富集分数（$[\%\mathrm{OAA_3}]$）的困难。

$$\frac{\mathrm{d}c_{\mathrm{L}}}{\mathrm{d}t}=v_{\text{lysine}}-Dc_{\mathrm{L}}=0 \tag{16}$$

对通量分配比 y 求解，得出：

$$y=\{[c_{L,5}-c_{L,3}]/c_L\}/\{2[\%Pyr_3]-[c_{L,3}+c_{L,5}]/c_L\} \quad (17)$$

式（17）表明如何根据碳位 3 标记的丙酮酸的给予，从赖氨酸在碳位 3 和 5 的相对富集度来确定两条赖氨酸合成途径的通量分配比。此计算需要细胞内丙酮酸的富集度，这可通过直接测量来确定。另一方法可以分泌的缬氨酸和（或）丙氨酸的标记富集度测量为基础，这两种氨基酸是直接从丙酮酸合成的。由于胞内丙酮酸库的可能的稀释及其程度一般是不知道的，因此，建议不要把［$\%Pyr_3$］设定为等于胞外丙酮酸的富集度。

上述方法仅在代谢稳态和同位素稳态下才有效。这种稳态可在恒化器中达到，然而，在稳定的赖氨酸生产条件下，实验上也可采用批式反应器。倘若式（17）中所标记的赖氨酸分数：$c_{L,3}/c_L$ 或 $c_{L,5}/c_L$ 分别用比率$(dc_{L,3}/dt)/(dc_L/dt)$或$(dc_{L,5}/dt)/(dc_L/dt)$代替，则前面的公式对批式反应器仍是有效的。当然，在批式反应器情况下，关于代谢稳态和同位素稳态假设的有效性是可疑的。然而，应注意的是，即使在一个本质上的瞬态系统中，胞内代谢物也可在一段时间内处于稳态。例如，在分批培养中经常遇到的恒定生物量浓度条件下，平衡生长或稳定生产就是这种情况。由于这些方法的不适当运用会产生错误的结果，因此，寻找可为稳态假设的有效性提供证据的内部检验点是很重要的。本例中，检验稳态假设有效性的一个方法就是当产品在反应器中积累时，将［3-^{13}C］赖氨酸和［5-^{13}C］赖氨酸的分数与总赖氨酸浓度一起作图。线性曲线可为相应时间内的代谢稳态和同位素稳态提供支持。

前述方法已在摇瓶实验和批式培养实验中检验过。摇瓶实验得出的估计是：由单步途径贡献的总赖氨酸通量在 30%～50%范围内。在一段短时间内在一个自动控制的分批培养中进行的仔细实验提供了惊人的信息。经过单步途径的通量，或者等价地，在 H4D 分支点的通量分配比随时间不是恒定的，而在发酵进程中是变化的。特别地，单步途径的通量在导入标记的葡萄糖脉冲后的短时间内，会显著地从几乎为零，上升至接近 100%，经过 5～7h 后，又下降至类似于引入脉冲前的水平。这个结果证实了胞内代谢物及催化相应反应的酶的体内调节对代谢通量所施加的控制，这两个重要因子决定了代谢网络中的通量分布。然而，应该注意到，由于没有采取适当的措施来确保或检验稳态环境，因此，应谨慎对待这些结果。这些结果在提供一个总趋势的判断力方面可能是正确的，但要对图 9.4 中两条途径的体内通量进行定量评价，则必须进行仔细设计好的实验。

【例 9.2】 乙酰辅酶 A 代谢中标记分布的分析

举例说明同位素标记分布和代谢通量估计的第二个例子如图 9.5 中的简单网络所示，它表示乙酰辅酶 A（AcCoA）代谢的双库模型［改自 Blum and Stein（1982）］。这样一个模型可用来描述乙酰辅酶 A 在线粒体和胞质溶胶之间的分布。在这个系统中，丙酮酸和己酸是能潜在地用^{13}C 或 ^{14}C 标记的底物。在库Ⅰ和库Ⅱ中，AcCoA 的原子当中同位素标记分布将是碳通量 $v_1 \sim v_6$，以及底物标记水平和模式的函数。通量 $v_1 \sim v_6$ 的单位为毫摩尔/(细胞·小时)。这里由于 AcCoA 是胞内代谢物，可以假设一个同位素稳态，这意味着流入胞内中间代谢物特定碳位上的标记与流出的标记碳是严格平衡的。推导出关于 AcCoA 碳原子的相对富集度的数学关系式，由这个关系式可确定胞内代谢通量，一个特定碳原子的富集度是用代谢物

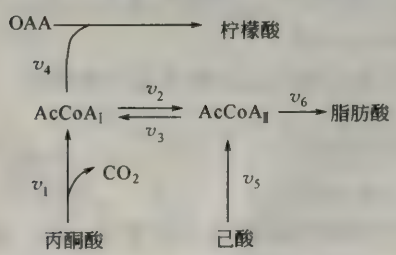


图 9.5 模拟 AcCoA 代谢的简单代谢网络

考虑了 AcCoA 的两个库，分别代表线粒体部分和细胞质部分，$v_1 \sim v_6$ 表示通量

名加上括号内的该碳位来表示。

现在对库Ⅰ中 AcCoA 的第1个碳原子构建稳态平衡。用 $AcCoA_{I}(1)$和 AcCoA(2)分别表示库Ⅰ中 AcCoA 的第1、2个碳原子的标记富集。有两个反应产生 $AcCoA_{I}$：(1) 丙酮酸的脱羧反应，总通量为 v_1，和 (2) $AcCoA_{II}$从库Ⅱ到库Ⅰ的转移，总通量为 v_3。

丙酮酸的第1个碳原子脱羧为 CO_2，而第2、3个碳原子分别变为 $AcCoA_{I}$的第1、2位碳原子。因此，从丙酮酸到 $AcCoA_{I}$的第1个碳原子的标记通量由乘积 $v_2Pry(2)$给出。$AcCoA_{II}$转移到 $AcCoA_{I}$不涉及化学反应，因此，$AcCoA_{II}$的第1、2位碳原子分别变为 $AcCoA_{I}$的第1、2位碳原子。这样，从 $AcCoA_{II}$至 $AcCoA_{I}$的第1位碳的标记通量是由乘积 $v_3AcCoA_{II}(1)$给定。进入 $AcCoA_{I}(1)$的总标记通量为这两个通量之和：

$$\text{进入 } AcCoA_{I}(1)\text{的通量} = v_1Pyr(2) + v_3AcCoA_{II}(1) \tag{1}$$

移去 $AcCoA_{I}$的两个反应是：与草酰乙酸（OAA）缩合形成柠檬酸，其通量为 v_4；AcCoA 从库Ⅰ至库Ⅱ的转移，其通量为 v_2。流出 $AcCoA_{I}$中的第1个碳原子的标记通量为 $AcCoA_{I}(1)$乘以通量 v_2、v_4之和。

$$\text{流出 } AcCoA_{I}(1)\text{的通量} = (v_2 + v_4)AcCoA_{I}(1) \tag{2}$$

在稳态下，进入 $AcCoA_{I}(1)$的标记通量将与流出通量严格平衡，使式（1）和式（2）相等，可得关于 $AcCoA_{I}$的第1个碳原子的稳态标记平衡：

$$(v_2 + v_4)AcCoA_{I}(1) = v_1Pyr(2) + v_3AcCoA_{II}(1) \tag{3}$$

同样地，对于 $AcCoA_{I}$的第2位碳原子的稳态同位素平衡，由下式给出：

$$(v_2 + v_4)AcCoA_{I}(2) = v_1Pyr(3) + v_3AcCoA_{II}(2) \tag{4}$$

对于库Ⅱ中的 AcCoA，重复上述步骤即可推出其稳态方程式。有两个反应产生 $AcCoA_{II}$：(1) 己酸的氧化反应，其总通量为 v_5；(2)AcCoA 从库Ⅰ至库Ⅱ的转移，其通量为 v_2。己酸的六个碳原子通过 β-氧化作用被成对移去，以致每个奇数碳原子和偶数碳原子分别对 $AcCoA_{II}$的第1、2位碳原子贡献1/3的比活性。因此，从己酸至 $AcCoA_{II}$的第1位碳原子的标记通量由乘积：$(v_5/3)[Hex(1) + Hex(3) + Hex(5)]$给定。由于 $AcCoA_{II}$转换为 $AcCoA_{I}$不涉及化学反应，因此，$AcCoA_{I}$至 $AcCoA_{II}$的第1位碳原子的标记通量由乘积 $v_2AcCoA_{I}(1)$给定。进入 $AcCoA_{II}(1)$的总标记通量为这两个通量之和：

$$\text{进入 } AcCoA_{II}(1)\text{的通量} = (v_3/3)[Hex(1) + Hex(3) + Hex(5)] + v_2AcCoA_{I}(1) \tag{5}$$

流出 $AcCoA_{II}$第1位碳原子的标记通量等于通量 v_3、v_6之和乘以比活性 $AcCoA_{II}$ (1)：

$$\text{流出 } AcCoA_{II}(1)\text{的通量} = (v_3 + v_6)AcCoA_{II}(1) \tag{6}$$

使式（5）和式（6）相等，得到 $AcCoA_{II}$的第1位碳原子的稳态标记平衡：

$$(v_3 + v_6)AcCoA_{II}(1) = (v_5/3)[Hex(1) + Hex(3) + Hex(5)] + v_2AcCoA_{I}(1) \tag{7}$$

同样地，$AcCoA_{II}$第2位碳原子的稳态同位素平衡可由下式给出：

$$(v_3 + v_6)AcCoA_{II}(2) = (v_5/3)[Hex(2) + Hex(4) + Hex(6)] + v_2AcCoA_{I}(2) \tag{8}$$

式（3），式（4），式（7）和式（8）可用矩阵形式表示如下：

$$\begin{pmatrix} \frac{v_2 + v_4}{v_1} & 0 & -\frac{v_3}{v_1} & 0 \\ 0 & \frac{v_2 + v_4}{v_1} & 0 & -\frac{v_3}{v_1} \\ -\frac{3v_2}{v_5} & 0 & \frac{3(v_3 + v_6)}{v_5} & 0 \\ 0 & -\frac{3v_2}{v_5} & 0 & \frac{3(v_3 + v_6)}{v_5} \end{pmatrix} \begin{pmatrix} AcCoA_{I}(1) \\ AcCoA_{I}(2) \\ AcCoA_{II}(1) \\ AcCoA_{II}(2) \end{pmatrix}$$

$$
= \begin{pmatrix} \mathrm{Pyr}(2) \\ \mathrm{Pyr}(3) \\ \mathrm{Hex}(1)+\mathrm{Hex}(3)+\mathrm{Hex}(5) \\ \mathrm{Hex}(2)+\mathrm{Hex}(4)+\mathrm{Hex}(6) \end{pmatrix} \tag{9}
$$

式(9)可求出 AcCoA 两个库中的富集度的解析解，例如，$\mathrm{AcCoA}_{\mathrm{II}}(1)$的解由下式给出：

$$
\mathrm{AcCoA}_{\mathrm{II}}(1)=\frac{v_1v_2}{v_2v_6+v_3v_4+v_4v_6}\mathrm{Pyr}(2)+\frac{v_5(v_2+v_4)}{3(v_2v_6+v_3v_4+v_4v_6)}[\mathrm{Hex}(1)+\mathrm{Hex}(3)+\mathrm{Hex}(5)] \tag{10}
$$

可以看出，式（9）提供了指定代谢物的富集度与六个代谢反应速率 $v_1 \sim v_6$ 之间的关系。在对丙酮酸和己酸采用预先确定了标记的实验中，式（9）中的右边项是已知的。此外，对丙酮酸和己酸的总吸收速率以及脂肪酸积累速率的测量结果也会分别得出反应速率 v_1、v_5 和 v_6 的估值。因此，两个 AcCoA 库中的两个碳原子的富集度的测量也可得出反应速率 v_2、v_3 和 v_4 估计值，并可提供一个额外冗余度，以检验整个系统的一致性。式（9）关于代谢物吸收和富集度测量的解可为两个库中的 AcCoA 相互转换以及因产能而进入柠檬酸循环的碳速率等提供很有价值的估计。

9.2 涉及同位素标记代谢物完全列出的应用

正如前面提到的，先前直接解释通过标记底物引入的同位素标记的结局（fate）的方法，能用于不含代谢循环的相对简单的网络。对于更复杂的网络，特别是那些含有循环的网络，用这样的方法来处理是非常困难的。在这种情况下，需要对所有可能的同位素标记代谢物（metabolite isotopomers）的产生进行解释，并且通过它们，确定代谢物不同碳位的预计标记富集度。

为了证明由于包含代谢循环而增加的复杂程度，跟踪经过一轮 TCA 循环后存在于丙酮酸第 3 位碳原子上的^{13}C 标记（[3-^{13}C] 丙酮酸）的结局（见图 9.6）。从 100% [3-^{13}C] 丙酮酸开始，所有的乙酰辅酶 A 都经丙酮酸脱氢酶反应在 C2 位上被标记。如果固定的碳酸氢盐是用$^{13}CO_2$ 标记，则由丙酮酸羧化酶催化的回补反应生成的草酰乙酸（OAA）将具有 O_{34} 形式；如果固定的碳酸氢盐未被标记，则草酰乙酸具有 O_3 形式。此外，假设从草酰乙酸到富马酸的逆反应与柠檬酸合成酶、PEP 羧激酶催化的反应相比是非常快速的话，则将导致草酰乙酸，琥珀酸，苹果酸及富马酸中 C1 和 C4 之间，以及 C2 和 C3 之间的碳标记完全对称平衡。该假设导致 O_{34}和 O_{12}的浓度及 O_3 和 O_2 的浓度分别相等。TCA 循环之后，O_{34}与 Ac_2 缩合将相继产生 C_{124}，K_{124}，S_{13}，$0.5F_{13}+0.5F_{24}$，$0.5M_{13}+0.5M_{24}$，以及 $0.5O_{13}+0.5O_{24}$。这样可以看出，O_{34}和 O_3 这两个同位素标记代谢物现已产生两个额外的草酰乙酸同位素标记代谢物，即 O_{13}和 O_{24}。后者（O_{24}）将经过另外几轮 TCA 循环而进一步被改变，导致更多 TCA 循环中间代谢物的同位素标记代谢物产生。显然，先前解释^{13}C 标记命运的方法，在处理由于多轮代谢循环而引入的额外复杂性时，是不充分的。处理这些情况的另一方法是使用同位素标记代谢物平衡。本节首先对整个方法作一般说明，然后对 TCA 循环同位素标记代谢物作全面分析。最后，用具体例子说明各种模式在阐明细胞代谢中的应用。

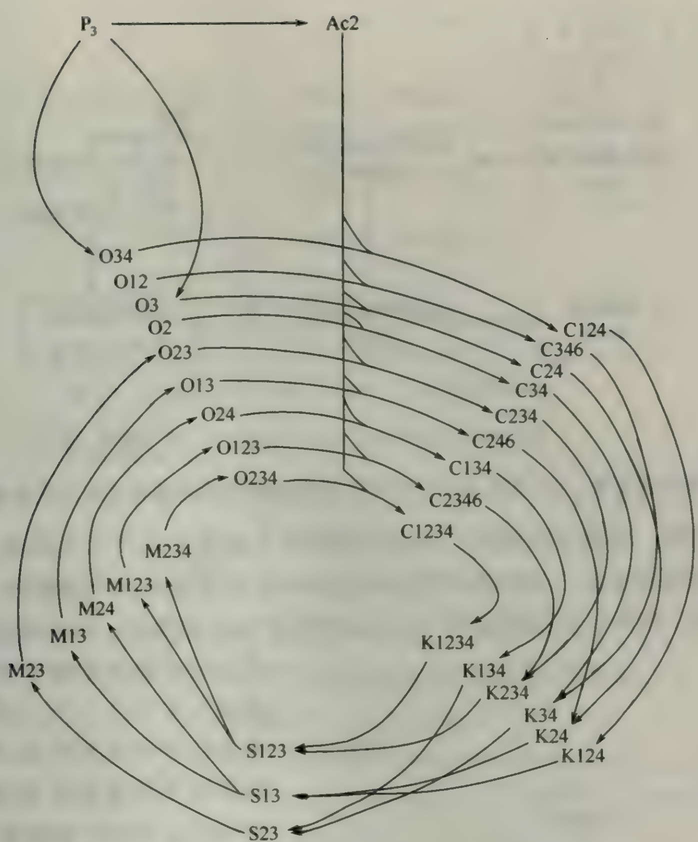


图 9.6　使用 100%富集的［3-^{13}C］丙酮酸经多轮 TCA 循环中间代谢物碳原子的连续标记示意

缩写　Ac，O，C，K，S，M 分别代表乙酰辅酶 A，草酰乙酸，柠檬酸，α-酮戊二酸，琥珀酸及苹果酸。代谢物符号后面的数字表示由^{13}C 标记的碳位

为采用该方法，应从完全列出所有可能的同位素标记代谢物开始，当应用于采用 100%［3-^{13}C］丙酮酸作为标记底物的 TCA 循环时，草酰乙酸、柠檬酸、α-酮戊二酸、琥珀酸以及苹果酸等的可能同位素标记代谢物如图 9.6 中所示。在这种情况下没有其它种类形成。应该注意的是，并不是所有可能的同位素标记代谢物种类的组合都出现。在这种情况下，例如，存在 $2^5=32$ 种 α-酮戊二酸，但根据假设的生物化学，只有 6 种出现。

下一步是写出出现在网络中的所有代谢物及其同位素标记代谢物的平衡方程式。这些方程包含代谢物及同位素标记代谢物的浓度，以及人们想要确定的胞内转化速率（通量）。在假设代谢稳态和同位素稳态条件下，这些平衡方程对于未知的代谢通量来说是线性方程式，并可直截了当地求出作为通量的函数的同位素标记化合物的相对浓度。最后一步是一个迭代试差过程，通过它确定未知的通量，以便最好地描述实验数据。从未知代谢通量的猜测值出发，相对同位素标记代谢物群体首先被确定，然后，核对下列一种或几种情况进行计算：(a) 各种代谢物碳原子的标记富集，(b) 借助 GC-MS（气相色谱-质谱仪）测量代谢物分子量分布，或 (c) 代谢物 NMR 谱的精细结构。将模型预测值与相应的标记富集度、分子量分布及 NMR 谱线强度等实验值进行比较，可得出未知通量的新估计值。这种迭代过程重复进行，直到模型预测值令人满意地与测量值一致，最终集中于其它观察不出的代谢通量的确定。图 9.7 给出了该试差过程的流程。

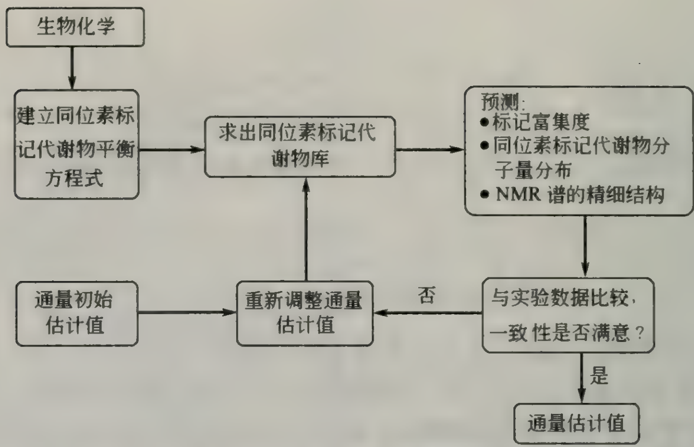


图 9.7 根据同位素富集、GC-MS 及 NMR 谱的细微结构等的测量确定胞内代谢通量的迭代法流程

在下面两节里，将推导出因引入标记丙酮酸或乙酸底物而产生的所有 TCA 循环同位素标记代谢物分布的表达式。这些推导可用来说明一个非常普遍的代谢循环中的同位素标记代谢物的列举方法。此外，将已报道的 TCA 结果用于几个实例中，以表明如何能从标记底物的实验中得到细胞生理学额外的洞察力。最后，在 9.2.3 节，我们将说明怎样根据前几节中得到的相对同位素标记代谢物群体来计算同位素标记富集、分子量分布以及 NMR 谱的细微结构。

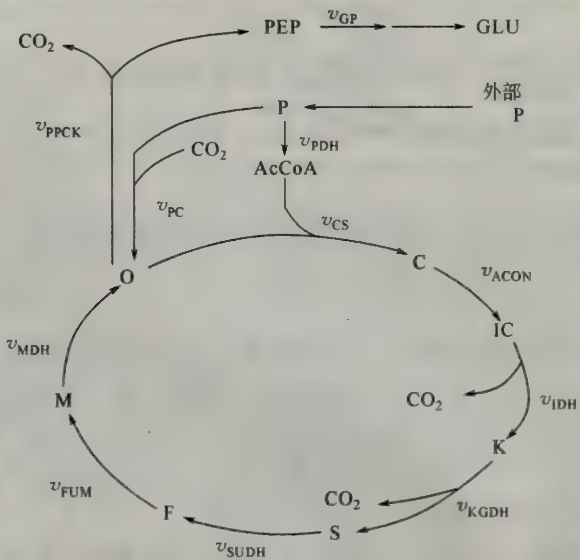


图 9.8 经由柠檬酸循环和糖异生途径的丙酮酸利用

通量的下标缩写如下：GP—糖异生途径；PDH—丙酮酸脱氢酶；CS—柠檬酸合成酶；ACON—顺乌头酸酶；KGDH—α-酮戊二酸脱氢酶；SUDH—琥珀酸脱氢酶；FUM—富马酸酶；MDH—苹果酸脱氢酶；PPCK—磷酸烯醇丙酮酸羧激酶；PC—丙酮酸羧化酶

代谢物的缩写如下　PEP—磷酸烯醇丙酮酸；P—丙酮酸；AcCoA—乙酰辅酶 A；C—柠檬酸；IC—异柠檬酸；K—α-酮戊二酸；S—琥珀酸；F—富马酸；M—苹果酸；O—草酰乙酸；CO_2—二氧化碳；GLU—葡萄糖

诸如 PEP→P→O→PEP 等无效循环假设是不活动的，其它反应，如用于生物合成的谷氨酸-草酰乙酸转氨酶以及谷氨酸脱氢酶等可被忽略

9.2.1 来自标记丙酮酸的 TCA 循环同位素标记代谢物的分布

图 9.8 描绘了经由 TCA 循环途径和普遍存在于真核生物中的糖异生途径的丙酮酸利用反应。假设磷酸烯醇丙酮酸（PEP）不是由丙酮酸经 PEP 酶直接形成的，而是由草酰乙酸（OAA）经 PEP 羧激酶生成的。丙酮酸直接羧化为草酰乙酸（OAA），或可转化为乙酰辅酶 A，然后，乙酰辅酶 A 与草酰乙酸缩合形成柠檬酸，柠檬酸经过 TCA 循环，最终又生成草酰乙酸。最后，PEP 经过糖酵解的 EM 途径的逆方向，或者说糖异生途径，可合成葡萄糖。

首先，写出图 9.8 网络中标出的代谢物的质量平衡。

$$\frac{dc_{AcCoA}}{dt} = v_{PDH} - v_{CS} \tag{9.3}$$

$$\frac{dc_C}{dt} = v_{CS} - v_{ACON} \tag{9.4}$$

$$\frac{dc_{IC}}{dt}=v_{ACON}-v_{IDH} \tag{9.5}$$

$$\frac{dc_{K}}{dt}=v_{IDH}-v_{KGDH} \tag{9.6}$$

$$\frac{dc_{S}}{dt}=v_{KGDH}-v_{SUDH} \tag{9.7}$$

$$\frac{dc_{F}}{dt}=v_{SUDH}-v_{FUM} \tag{9.8}$$

$$\frac{dc_{M}}{dt}=v_{FUM}-v_{MDH} \tag{9.9}$$

$$\frac{dc_{O}}{dt}=v_{MDH}+v_{PC}-v_{CS}-v_{PPCK} \tag{9.10}$$

$$r_{CO_2}=v_{IDH}+v_{KGDH}-v_{PC}+v_{PPCK} \tag{9.11}$$

$$\frac{dc_{PEP}}{dt}=v_{PPCK}-v_{GP} \tag{9.12}$$

$$\frac{dc_{P}}{dt}=v_{IMPORT}-v_{PC}-v_{PDH} \tag{9.13}$$

在代谢稳态下，没有胞内代谢物积累，由式（9.3）~式(9.13）可得：

$$\begin{aligned} v_{CS}&=v_{PDH}=v_{ACON}=v_{IDH}=v_{KGDH} \\ &=v_{SUDH}=v_{FUM}=v_{MDH} \end{aligned} \tag{9.14}$$

$$v_{PC}=v_{PPCK} \tag{9.15}$$

$$v_{CO_2}=2v_{CS} \tag{9.16}$$

$$v_{PC}=v_{GP} \tag{9.17}$$

$$v_{IMPORT}=v_{PC}+v_{CS} \tag{9.18}$$

与总代谢物浓度相似，根据 100%［3-^{13}C］丙酮酸的给予而出现于图 9.6 中的每个同位素标记代谢物的浓度写出平衡方程式：

$$\frac{dc_O}{dt}\begin{bmatrix}O_3\\O_2\\O_{34}\\O_{12}\\O_{13}\\O_{24}\\O_{123}\\O_{234}\\O_{23}\end{bmatrix}=v_{MDH}\begin{bmatrix}0\\0\\0\\0\\M_{13}\\M_{24}\\M_{123}\\M_{234}\\M_{23}\end{bmatrix}+v_{PC}\begin{bmatrix}\left(\frac{1-CO_2^*}{2}\right)\\\left(\frac{1-CO_2^*}{2}\right)\\\left(\frac{CO_2^*}{2}\right)\\\left(\frac{CO_2^*}{2}\right)\\0\\0\\0\\0\\0\end{bmatrix}-v_{CS}\begin{bmatrix}O_3\\O_2\\O_{34}\\O_{12}\\O_{13}\\O_{24}\\O_{123}\\O_{234}\\O_{23}\end{bmatrix}-v_{PPCK}\begin{bmatrix}O_3\\O_2\\O_{34}\\O_{12}\\O_{13}\\O_{24}\\O_{123}\\O_{234}\\O_{23}\end{bmatrix} \tag{9.19}$$

在前面等式中，每个同位素标记化合物种类是以相对群体表示的，即，其浓度用同一代谢物的总浓度进行归一化处理（如 $O_3=c_{O,3}/c_O$），CO_2^* 是带有^{13}C 标记的 CO_2 的分数。

类似于草酰乙酸，也可对柠檬酸/异柠檬酸（用 C 表示）、α-酮戊二酸、琥珀酸、苹果

酸以及用^{13}C标记的CO_2的分数CO_2^*等写出同位素标记化合物平衡［分别为式（9.20）~式（9.24）］。

$$\frac{dc_C}{dt}=v_{CS}\begin{bmatrix}O_3\\O_2\\O_{34}\\O_{12}\\O_{13}\\O_{24}\\O_{123}\\O_{234}\\O_{23}\end{bmatrix}-v_{IDH}\begin{bmatrix}C_{24}\\C_{34}\\C_{124}\\C_{346}\\C_{246}\\C_{134}\\C_{2346}\\C_{1234}\\C_{234}\end{bmatrix} \quad (9.20)$$

(left-hand side vector: $\begin{bmatrix}C_{24}\\C_{34}\\C_{124}\\C_{346}\\C_{246}\\C_{134}\\C_{2346}\\C_{1234}\\C_{234}\end{bmatrix}$)

$$\frac{dc_K}{dt}\begin{bmatrix}K_{24}\\K_{34}\\K_{124}\\K_{134}\\K_{234}\\K_{1234}\end{bmatrix}=v_{IDH}\begin{bmatrix}C_{24}+C_{246}\\C_{34}+C_{346}\\C_{124}\\C_{134}\\C_{2346}+C_{234}\\C_{1234}\end{bmatrix}-v_{KGDH}\begin{bmatrix}K_{24}\\K_{34}\\K_{124}\\K_{134}\\K_{234}\\K_{1234}\end{bmatrix} \quad (9.21)$$

$$\frac{dc_S}{dt}\begin{bmatrix}S_{23}\\S_{13}\\S_{123}\end{bmatrix}=v_{KGDH}\begin{bmatrix}K_{134}+K_{34}\\K_{24}+K_{124}\\K_{1234}+K_{234}\end{bmatrix}-v_{SUDH}\begin{bmatrix}S_{23}\\S_{13}\\S_{123}\end{bmatrix} \quad (9.22)$$

$$\frac{dc_M}{dt}\begin{bmatrix}M_{23}\\M_{13}\\M_{24}\\M_{123}\\M_{234}\end{bmatrix}=v_{SUDH}\begin{bmatrix}S_{23}\\\frac{1}{2}S_{13}\\\frac{1}{2}S_{13}\\\frac{1}{2}S_{123}\\\frac{1}{2}S_{123}\end{bmatrix}-v_{MDH}\begin{bmatrix}M_{23}\\M_{13}\\M_{24}\\M_{123}\\M_{234}\end{bmatrix} \quad (9.23)$$

$$r_{CO_2}CO_2^*=v_{IDH}(C_{346}+C_{246}+C_{2346})+v_{KGDH}(K_{124}+K_{134}+K_{1234})$$
$$-v_{PC}(CO_2^*)+v_{PPCK}(O_{34}+O_{24}+O_{234}) \quad (9.24)$$

在代谢和同位素稳态下，运用式（9.22）、式（9.23）和式（9.14），可得：

$$\begin{bmatrix}M_{23}\\M_{13}\\M_{24}\\M_{123}\\M_{234}\end{bmatrix}=\begin{bmatrix}K_{134}+K_{34}\\\frac{1}{2}(K_{24}+K_{124})\\\frac{1}{2}(K_{24}+K_{124})\\\frac{1}{2}(K_{1234}+K_{234})\\\frac{1}{2}(K_{1234}+K_{234})\end{bmatrix} \quad (9.25)$$

同样地，从式（9.20）、式（9.21）和式（9.14），可得：

$$\begin{bmatrix} K_{24} \\ K_{34} \\ K_{124} \\ K_{134} \\ K_{234} \\ K_{1234} \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} O_3 + O_{13} \\ O_2 + O_{12} \\ O_{34} \\ O_{24} \\ O_{123} + O_{23} \\ O_{234} \end{bmatrix} \tag{9.26}$$

结合式（9.25）和式（9.26），并将所得的苹果酸同位素标记化合物的表达式插入式（9.19）的稳态形式中，则可得代谢及同位素稳态下，草酰乙酸的同位素标记化合物平衡：

$$v_{CS}\begin{bmatrix} 0 \\ 0 \\ 0 \\ 0 \\ \frac{1}{2}(O_3 + O_{13} + O_{34}) \\ \frac{1}{2}(O_3 + O_{13} + O_{34}) \\ \frac{1}{2}(O_{234} + O_{123} + O_{23}) \\ \frac{1}{2}(O_{234} + O_{123} + O_{23}) \\ (O_{24} + O_2 + O_{12}) \end{bmatrix} + v_{PC}\begin{bmatrix} \left(\frac{1 - CO_2^*}{2}\right) \\ \left(\frac{1 - CO_2^*}{2}\right) \\ \left(\frac{CO_2^*}{2}\right) \\ \left(\frac{CO_2^*}{2}\right) \\ 0 \\ 0 \\ 0 \\ 0 \\ 0 \end{bmatrix} = (v_{CS} + v_{PC})\begin{bmatrix} O_3 \\ O_2 \\ O_{34} \\ O_{12} \\ O_{13} \\ O_{24} \\ O_{123} \\ O_{234} \\ O_{23} \end{bmatrix} \tag{9.27}$$

式（9.27）表明所有的草酰乙酸同位素标记化合物可仅仅从二氧化碳的相对富集度、柠檬酸合成酶通量（v_{CS}）和丙酮酸羧化酶通量（v_{PC}）来求得。前面的分析也可直接应用于所有其它的同位素标记化合物，以推导它们在代谢及同位素稳态下也以 v_{CS}和 v_{PC}的形式来确定的方程式。因此，v_{CS}和 v_{PC}是仅有的一些未知项，根据它们就可计算所有同位素标记化合物的相对群体，而且通过它们也可计算中间代谢物的标记富集度。

可用 x 和 y 很方便地表示解析结果。定义 x 为草酰乙酸经由 PEP 羧激酶（PPCK）反应而离开 TCA 循环的概率［（$1-x$）则表示草酰乙酸经柠檬酸合成酶（CS）反应而重新进入 TCA 循环的概率］，而定义 y 为固定到将被^{13}C 标记的丙酮酸的碳酸氢盐，即 CO_2^* 的概率。若用 x 表示，则可写出：

$$\frac{x}{1-x} = \frac{v_{PPCK}}{v_{CS}} = \frac{v_{PC}}{v_{CS}} \tag{9.28}$$

此外，如果除了模型中指出的反应外，没有其它途径产生和消耗 CO_2，则可只用 x 来表示 y。表 9.1 总结了当用 100％富集丙酮酸作底物时，以 x 和 y 这两个概率表示的草酰乙酸和谷氨酸同位素标记化合物相对群体的结果。表 9.1 也提供了用 x 确定 y 的表达式，以及表示了从所指出的在三个不同碳原子标记的丙酮酸合成葡萄糖和谷氨酸分子的相对富集度。图 9.9 表示了当分别用 100％富集［2-^{13}C］丙酮酸和 100％富集［1-^{13}C］丙酮酸作标记底物时产生的可能的同位素标记化合物。应注意，表 9.1 的结果可以用来对任何其它的同位素标记化合物或代谢物富集度与实验数据（若可获得的话）进行比较。另外，G 和 K 可交换使用，因为谷氨酸和 α-酮戊二酸的同位素标记化合物的分布是相同的。

表 9.1　草酰乙酸（O）和谷氨酸（G）的同位素标记化合物的稳态分布及葡萄糖和谷氨酸中的相对碳富集度

项目	[3-^{13}C]丙酮酸	[2-^{13}C]丙酮酸	[1-^{13}C]丙酮酸
y	$y=\frac{1-x}{2+x-x^2}$	$y=\frac{1+x-2x^2}{2+x-x^2}$	$y=\frac{x}{2-x}$
草酰乙酸同位素标记化合物分布	$O_2=O_3=\frac{x(1-y)}{2}$ $O_{12}=O_{34}=\frac{xy}{2}$ $O_{23}=\frac{(1-x)x}{(1+x)}$ $O_{13}=O_{24}=\frac{(1-x)x}{2(1+x)}$ $O_{123}=O_{234}=\frac{(1-x)^2}{2(1+x)}$	$O_2=O_3=\frac{x(1-y)}{2}$ $O_{13}=O_{24}=\frac{x(1-x+y+xy)}{2(1+x)}$ $O_{14}=\frac{x(1-x)}{(1+x)}$ $O_1=O_4=\frac{(1-x)^2}{2(1+x)}$	$O_1=O_4=\frac{x(1-y)}{2}$ $O_{14}=xy$ $O=1-x$
葡萄糖富集模式	$C\text{-}1=\frac{1}{(1+x)}$ $C\text{-}2=\frac{1}{(1+x)}$ $C\text{-}3=\frac{1-x+xy+x^2y}{2(1+x)}$	$C\text{-}1=\frac{x}{(1+x)}$ $C\text{-}2=\frac{x}{(1+x)}$ $C\text{-}3=\frac{1+x-2x^2+xy+x^2y}{2(1+x)}$	$C\text{-}1=0$ $C\text{-}2=0$ $C\text{-}3=\frac{x(1+y)}{2}$
谷氨酸同位素标记化合物分布	$K_{24}=\frac{x(2-y-xy)}{2(1+x)}$ $K_{34}=\frac{x}{2}$ $K_{124}=\frac{xy}{2}$ $K_{134}=\frac{x(1-x)}{2(1+x)}$ $K_{234}=\frac{1-x}{2}$ $K_{1234}=\frac{(1-x)^2}{2(1+x)}$	$K_{35}=\frac{x(1-y)}{2}$ $K_{135}=\frac{x(1-x+y+xy)}{2(1+x)}$ $K_{25}=\frac{x}{1+x}$ $K_{15}=\frac{1-x}{2}$ $K_5=\frac{(1-x)^2}{2(1+x)}$	$K=\frac{2-x-xy}{2}$ $K_1=\frac{x(1+y)}{2}$
谷氨酸富集模式	$C\text{-}1=\frac{1-x+xy+x^2y}{2(1+x)}$ $C\text{-}2=\frac{1}{1+x}$ $C\text{-}3=\frac{1}{1+x}$ $C\text{-}4=1$ $C\text{-}5=0$	$C\text{-}1=\frac{1+x-2x^2+xy+x^2y}{2(1+x)}$ $C\text{-}2=\frac{x}{1+x}$ $C\text{-}3=\frac{x}{1+x}$ $C\text{-}4=0$ $C\text{-}5=1$	$C\text{-}1=\frac{x(1+y)}{2}$ $C\text{-}2=0$ $C\text{-}3=0$ $C\text{-}4=0$ $C\text{-}5=0$

注：通过图 9.8 所示的主要途径利用 100%［3-^{13}C］丙酮酸、100%［2-^{13}C］丙酮酸及 100%［1-^{13}C］丙酮酸标记。

正如第一行所示，y 只能作为 x 的函数而求得。G 和 K 可交换使用，因为这二者的标记模式是相同的。用这些底物经糖异生途径生成的葡萄糖具有下列富集模式：$C\text{-}4=C\text{-}3$；$C\text{-}5=C\text{-}2$；$C\text{-}6=C\text{-}1$。

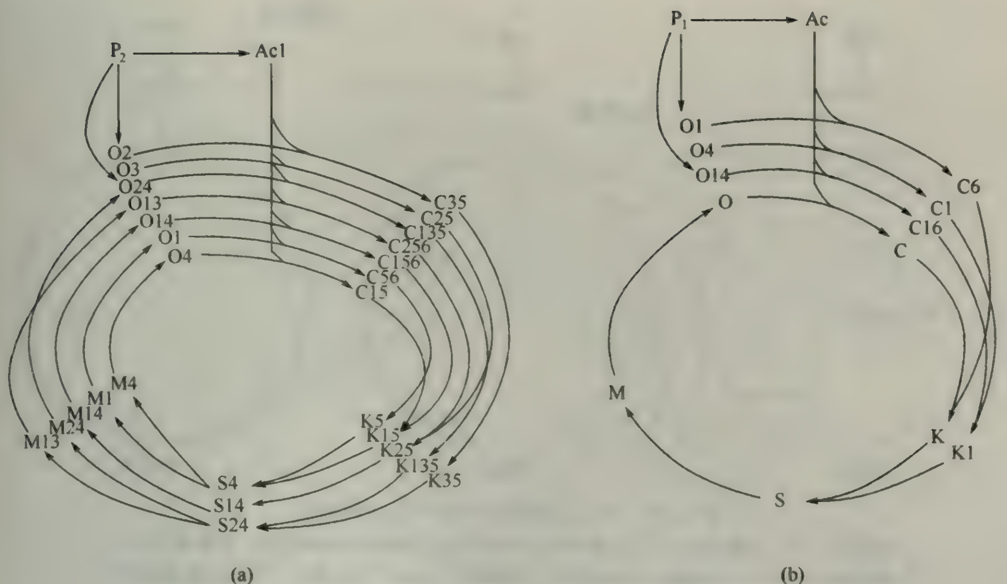


图 9.9　中间代谢物经多轮 TCA 循环的连续标记示意

通过用（a）100%富集的［2-^{13}C］丙酮酸，（b）100%富集的［1-^{13}C］丙酮酸进行标记

现对在推导表 9.1 中的表达式时所运用的假设作一总结，并作为本节的结束。

- 由于无效循环，如：丙酮酸→OAA→PEP→丙酮酸，以及苹果酸→丙酮酸→OAA→苹果酸等的运行，不存在标记循环。
- 不存在代谢物区室化，但存在 TCA 循环和其它途径共用的均一库。
- 除葡萄糖生成之外，没有到生物合成的净的通量。
- PPP 的运行不会造成标记争夺，PPP 会使经糖异生途径合成的葡萄糖的标记重新分布。
- 可以达到代谢稳态及同位素稳态。
- 输入底物是同位素纯的。它们在指定的碳位上是 100%富集的，在未指定的碳位上则没有富集。
- 由于存在未标记的内源库，同位素稀释可忽略。

9.2.2　来自标记乙酸的 TCA 循环同位素标记代谢物的分布

图 9.10 总结了关于乙酸利用的 3 种可能模型。模型Ⅰ表示经由乙醛酸支路（GS）的乙酸利用，这条途径在许多细菌中存在。由于该途径补充因生物合成而流出的 TCA 循环中间物，所以，它的运行对以乙酸作为单一碳源的细菌来说是必需的。通过控制异柠檬酸分支点处的碳流量，细菌对碳的利用保持严格平衡，以满足产能和生物合成要求。当异柠檬酸相继被异柠檬酸脱氢酶以及 TCA 循环的一些酶催化时，将产生用于产能的 NADH。另一方面，在异柠檬酸裂合酶的作用下，异柠檬酸可转化为琥珀酸和乙醛酸，而乙醛酸与乙酰辅酶 A 缩合形成苹果酸。这样，经过 GS 途径，2 分子乙酸形成 1 分子草酰乙酸。

已经证实，哺乳动物只通过转化为乙酰辅酶 A 来利用乙酸，乙酰辅酶 A 随后在 TCA 循环中进行分解代谢（见图 9.10 模型Ⅱ）。然而，由于一些中间代谢物要流出 TCA 循环，提供生物合成前体，诸如谷氨酸、谷氨酰胺。因此，为了保持一平衡的稳态流量，必须存在独立的回补源，以供草酰乙酸生物合成。将考虑有关乙酸利用的两种情况，第一个情况如模型

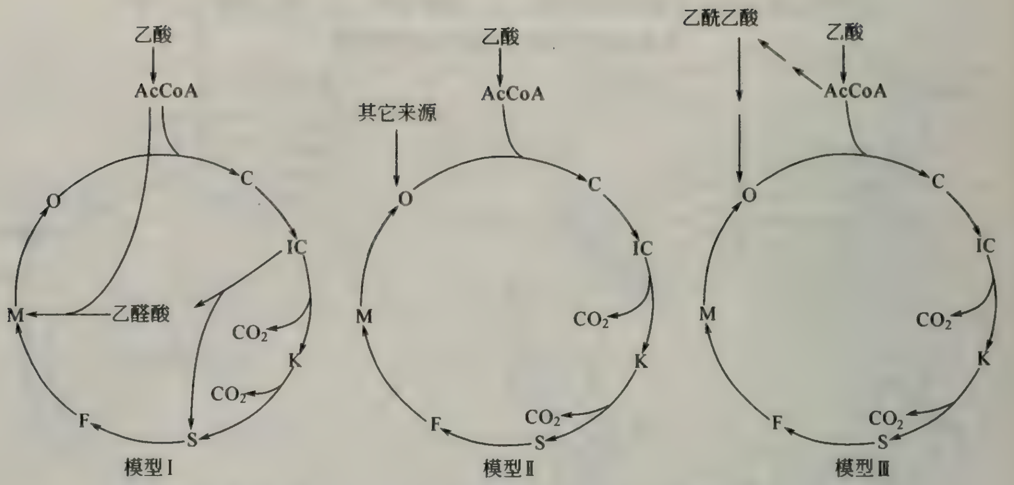


图 9.10　关于乙酸利用所建议的 3 种模型

在模型Ⅰ中，乙酸是通过 TCA 循环和乙醛酸支路这两条途径被利用的。在模型Ⅱ中，乙酸仅通过转化为乙酰辅酶 A 而被利用。乙酰辅酶 A 经过 TCA 循环。草酰乙酸是从其它内源性代谢物补充的。在模型Ⅲ中，乙酸转化为乙酰辅酶 A，而且也可通过乙酰乙酸-乳酸-丙酮酸途径成为草酰乙酸生物合成的来源。模型Ⅲ途径尚未完全证实

Ⅱ所述，就是普遍接受的途径，乙酸在乙酰辅酶 A 合成酶作用下仅经乙酰辅酶 A 转化而被利用。在这种情况下，存在另一代谢物源供草酰乙酸生成之用。第二种情况就是模型Ⅲ中的草酰乙酸补充，是一条假设途径，在这条途径中，草酰乙酸直接从乙酸生成。这可通过两个乙酰辅酶 A 分子缩合生成草酰乙酸来实现。草酰乙酸进而又脱羧生成乳酸或丙酮酸，它们最后成为草酰乙酸的来源。从草酰乙酸合成 C_3 代谢物（例如乳酸或丙酮酸）的途径尚未完全证实。但由于有证据表明，在绵羊中存在从乙酸合成 3-羟基丁酸（Annison et al，1963），且在鼠肝脏中存在从标记的乙酸合成标记的草酰乙酸（Desmaulin et al，1985），因此，这条假设途径并不是行不通的。包括模型Ⅲ的目的就是检验任何标记研究是否与该模型相一致。由于在这种情况下，若输入的乙酸是标记的，则进入 TCA 循环的草酰乙酸也总是标记的。在哺乳动物中没有发现 GS 途径。

为了分析这种情况，完全按照 9.2.1 节所述相同的方法继续进行，首先列出如图 9.11 和图 9.12 所示的可能的同位素标记化合物，这两图分别对应于 100%[2-^{13}C] 乙酸和 100%[1-^{13}C] 乙酸的情况。然后写出代谢物平衡和同位素平衡，并应用稳态假设，求出草酰乙酸同位素标记化合物相对浓度的解，进而通过它们得到葡萄糖和谷氨酸的富集模式。有关 [2-^{13}C] 乙酸和 [1-^{13}C] 乙酸的结果分别总结列于表 9.2 和表 9.3 中。关于乙酸利用，还可引入另一个变量 z 以表示异柠檬酸经 GS 途径被利用的概率。而 $(1-z)$ 则表示经 TCA 循环所利用的异柠檬酸的分数。因此，经由 GS 途径的通量与经由 TCA 循环的通量之比可表示为

$$\frac{z}{1-z}=\frac{v_{GS}}{v_{TCA}} \tag{9.29}$$

注意：表 9.1～表 9.3 的结果对 100% 富集丙酮酸和乙酸有效。

9.2.3　实验数据整理

大多数代谢 NMR 实验主要集中在特定代谢物碳原子的^{13}C 标记富集度。表 9.1～表 9.3

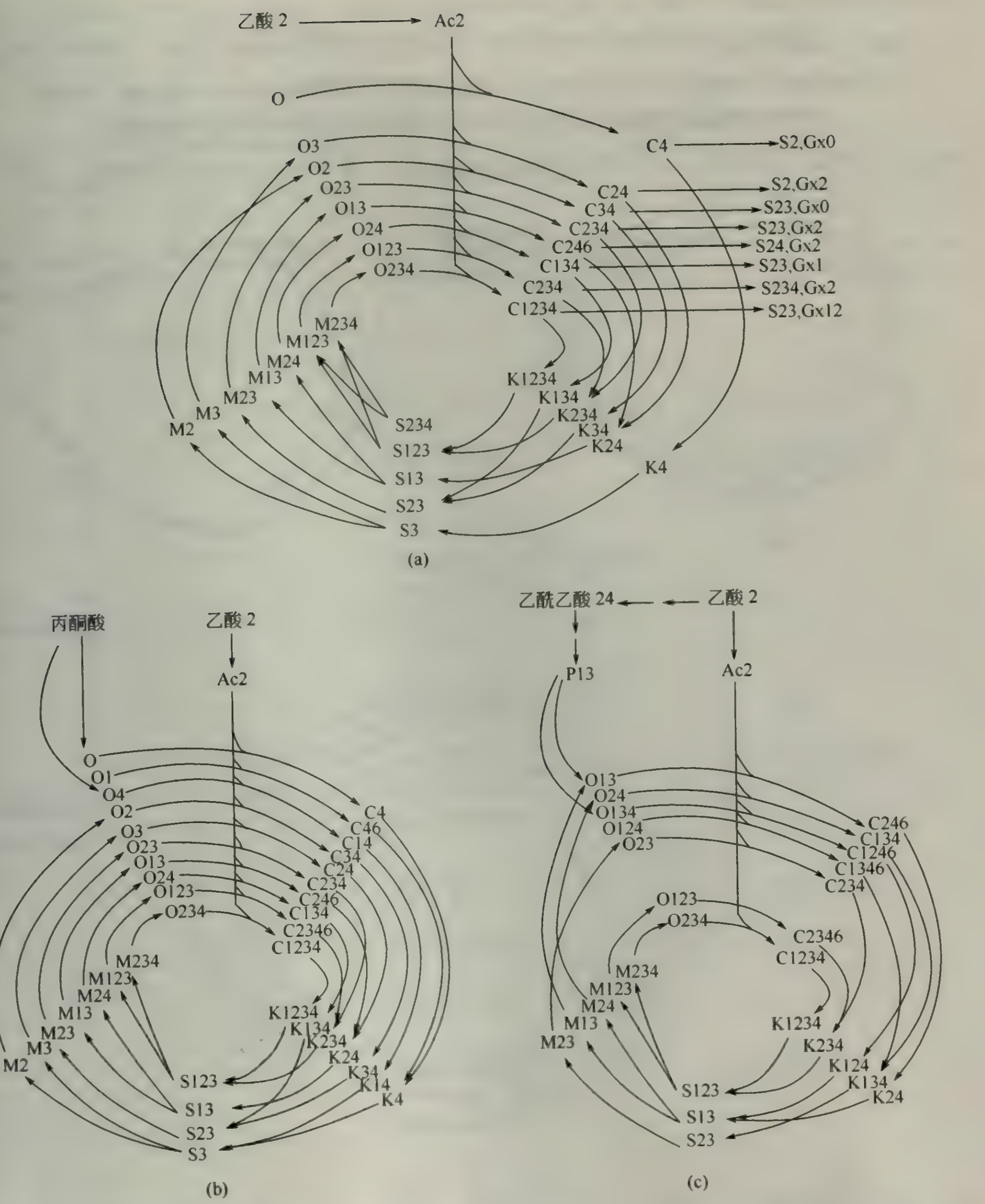


图 9.11　对于 100%［2-^{13}C］乙酸经过多轮 TCA 循环后中间代谢物碳原子的连续标记示意
图 9.10 的模型 Ⅰ～Ⅲ分别对应于（a）～（c）

的结果不仅允许这样的标记富集度数据的正确解释，而且也可扩大信息量，这些信息可通过分析 NMR 谱的细微结构以及标记代谢物的分子量分布测量结果而得到。

关于^{13}C 富集度数据，不同碳原子的富集度可通过运用表 9.1～表 9.3 中的表达式，计算相应同位素标记化合物的相对浓度之和来求得。例如，参照 100%［3-^{13}C］丙酮酸的使用，α-酮戊二酸每个碳位上的相对富集度可按在特定碳位含有标记碳的所有同位素标记化合

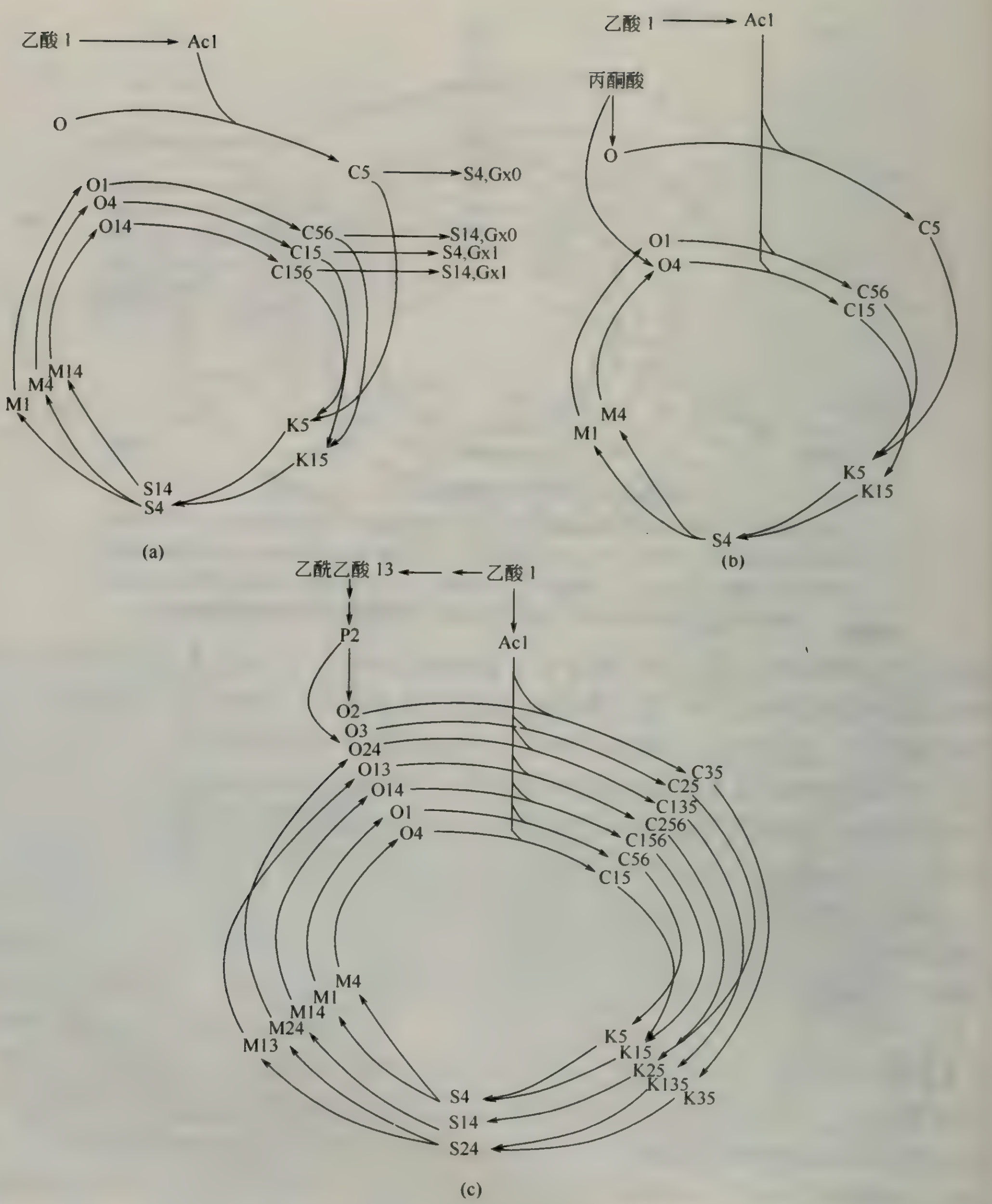


图 9.12 对于 100％［1-^{13}C］乙酸经过多轮 TCA 循环后中间代谢物碳原子的连续标记示意
图 9.10 的模型Ⅰ～Ⅲ分别对应于（a）～（c）

物种类之和来计算，这反映在下列等式中：

$$
\begin{aligned}
C\text{-}1 &= K_{124}+K_{134}+K_{1234} \\
C\text{-}2 &= K_{24}+K_{124}+K_{234}+K_{1234} \\
C\text{-}3 &= K_{34}+K_{134}+K_{234}+K_{1234} \\
C\text{-}4 &= K_{24}+K_{34}+K_{124}+K_{134}+K_{234}+K_{1234}=1 \\
C\text{-}5 &= 0
\end{aligned}
\tag{9.30}
$$

如表 9.1～表 9.3 中表达式所示，α-酮戊二酸同位素标记化合物的相对浓度是代谢通量或代谢通量比的函数，因此，标记富集度数据提供了有关体内代谢通量大小的信息。

表 9.2 通过图 9.10 所示的三条不同模型途径引入 100% [2-^{13}C] 乙酸后，草酰乙酸和谷氨酸的同位素标记化合物的稳态分布及葡萄糖和谷氨酸中的相对碳富集度

项目	经模型Ⅰ途径利用[2-^{13}C]乙酸	经模型Ⅱ途径利用[2-^{13}C]乙酸	经模型Ⅲ途径利用[2-^{13}C]乙酸
y		$y=\frac{(1-x)^2}{2+x-x^2}$	$y=\frac{1+x^2}{2+x-x^2}$
草酰乙酸同位素标记化合物分布	$O_{23}=z$ $O_{123}=O_{234}=\frac{1-z}{2}$	$O=x-xy$ $O_1=O_4=\frac{xy}{2}$ $O_2=O_3=\frac{x(1-x)}{2}$ $O_{23}=\frac{(1-x)^2x}{(1+x)}$ $O_{13}=O_{24}=\frac{(1-x)^2x}{2(1+x)}$ $O_{123}=O_{234}=\frac{(1-x)^3}{2(1+x)}$	$O_{13}=O_{24}=\frac{x(2-y-xy)}{2(1+x)}$ $O_{134}=O_{124}=\frac{xy}{2}$ $O_{23}=\frac{x(1-x)}{(1+x)}$ $O_{123}=O_{234}=\frac{(1-x)^2}{2(1+x)}$
葡萄糖富集模式	$C\text{-}1=1$ $C\text{-}2=1$ $C\text{-}3=\frac{1-z}{2}$	$C\text{-}1=\frac{1-x}{(1+x)}$ $C\text{-}2=\frac{1-x}{(1+x)}$ $C\text{-}3=\frac{1-2x+x^2+xy+x^2y}{2(1+x)}$	$C\text{-}1=\frac{1}{(1+x)}$ $C\text{-}2=\frac{1}{(1+x)}$ $C\text{-}3=\frac{1+x^2+xy+x^2y}{2(1+x)}$
谷氨酸同位素标记化合物分布	$K_{234}=\frac{1+z}{2}$ $K_{1234}=\frac{1-z}{2}$	$K_4=x-\frac{xy}{2}$ $K_{14}=\frac{xy}{2}$ $K_{24}=\frac{x(1-x)}{(1+x)}$ $K_{34}=\frac{(1-x)x}{2}$ $K_{134}=\frac{x(1-x)^2}{2(1+x)}$ $K_{234}=\frac{(1-x)^2}{2}$ $K_{1234}=\frac{(1-x)^3}{2(1+x)}$	$K_{24}=\frac{x(2-y-xy)}{2(1+x)}$ $K_{134}=\frac{x}{(1+x)}$ $K_{124}=\frac{xy}{2}$ $K_{234}=\frac{1-x}{2}$ $K_{1234}=\frac{(1-x)^2}{2(1+x)}$
谷氨酸富集模式	$C\text{-}1=\frac{1-z}{2}$ $C\text{-}2=1$ $C\text{-}3=1$ $C\text{-}4=1$ $C\text{-}5=0$	$C\text{-}1=\frac{1-2x+x^2+xy+x^2y}{2(1+x)}$ $C\text{-}2=\frac{1-x}{1+x}$ $C\text{-}3=\frac{1-x}{1+x}$ $C\text{-}4=1$ $C\text{-}5=0$	$C\text{-}1=\frac{xy+x^2y+1+x^2}{2(1+x)}$ $C\text{-}2=\frac{1}{(1+x)}$ $C\text{-}3=\frac{1}{1+x}$ $C\text{-}4=1$ $C\text{-}5=0$

注：在模型Ⅱ、Ⅲ中，x 表示 9.2.1 节所述的经丙酮酸羧化酶进入草酰乙酸库的相对通量。此外，正如第一行所示，y 可作为 x 的函数而求得。本表对应于图 9.11 所示的途径。

表 9.3 通过图 9.10 所示的三条不同模型途径引入 100% [1-^{13}C] 乙酸后，草酰乙酸和谷氨酸的同位素标记化合物的稳态分布及葡萄糖和谷氨酸中的相对碳富集度

项目	经模型Ⅰ途径利用[1-^{13}C]乙酸	经模型Ⅱ途径利用[1-^{13}C]乙酸	经模型Ⅲ途径利用[1-^{13}C]乙酸
y		$y=\frac{1-x}{2-x}$	$y=\frac{1+x-2x^2}{2+x-x^2}$
草酰乙酸同位素标记化合物分布	$O_{14}=z$ $O_1=O_4=\frac{1-z}{2}$	$O=x-xy$ $O_1=O_4=\frac{1-x+xy}{2}$	$O_2=O_3=\frac{x(1-y)}{2}$ $O_{13}=O_{24}=\frac{x(1-x+y+xy)}{2(1+x)}$ $O_{14}=\frac{x(1-x)}{(1+x)}$ $O_1=O_4=\frac{(1-x)^2}{2(1+x)}$
葡萄糖富集模式	$C\text{-}1=0$ $C\text{-}2=0$ $C\text{-}3=\frac{1+z}{2}$	$C\text{-}1=0$ $C\text{-}2=0$ $C\text{-}3=\frac{1-x+xy}{2}$	$C\text{-}1=\frac{x}{(1+x)}$ $C\text{-}2=\frac{x}{(1+x)}$ $C\text{-}3=\frac{1+x-2x^2+xy+x^2y}{2(1+x)}$
谷氨酸同位素标记化合物分布	$K_{15}=\frac{1-z}{2}$ $K_5=\frac{1+z}{2}$	$K_{15}=\frac{1-x+xy}{2}$ $K_5=\frac{1+x-xy}{2}$	$K_{35}=\frac{x(1-y)}{2}$ $K_{135}=\frac{x(1-x+y+xy)}{2(1+x)}$ $K_{25}=\frac{x}{1+x}$ $K_{15}=\frac{1-x}{2}$ $K_5=\frac{(1-x)^2}{2(1+x)}$
谷氨酸富集模式	$C\text{-}1=\frac{1-z}{2}$ $C\text{-}2=0$ $C\text{-}3=0$ $C\text{-}4=0$ $C\text{-}5=1$	$C\text{-}1=\frac{1-x+xy}{2}$ $C\text{-}2=0$ $C\text{-}3=0$ $C\text{-}4=0$ $C\text{-}5=1$	$C\text{-}1=\frac{1+x-2x^2+xy+x^2y}{2(1+x)}$ $C\text{-}2=\frac{x}{1+x}$ $C\text{-}3=\frac{x}{1+x}$ $C\text{-}4=0$ $C\text{-}5=1$

注：本表对应于图 9.12 所示的途径。

根据表 9.1～表 9.3 中的同位素标记化合物分布，可进一步分析特定碳位上 NMP 峰的细微结构。由于同位素标记化合物的相对数量取决于相对代谢通量分布（正如表 9.1～表 9.3 中等式的参数 x 和 y 表示的）。因此，很显然，NMR 谱的细微结构包含有关代谢通量总体分布的有用信息。有关同位素标记化合物相对数量的同样表达式，可进一步用来确定不同标记代谢物的分子量分布。例如，由于所有的谷氨酸同位素标记化合物可望带有至少一个^{13}C 碳原子，因此，从表 9.1 可以看出，具有正常分子量 M 的谷氨酸分子（相当于所有碳原子都没有^{13}C）的相对数量为零。同样地，分子量为（$M+1$）的同位素标记化合物的相

对数量也等于零。然而，分子量为（$M+2$）的谷氨酸的相对数量将等于 K_{24}与 K_{34}之和。分子量为（$M+3$）的谷氨酸的相对数量将等于 K_{124}、K_{134}及 K_{234}之和。最后，分子量为（$M+4$）的谷氨酸的相对数量将等于 K_{1234}。这样的分子量分布可通过气相色谱-质谱联用来获得，并可提供有关同位素标记化合物的来源及相应代谢通量的更多信息。

应该注意的是，计算中加入了大量的冗余度。例如，在表 9.1～表 9.3 所考虑的情况中，同位素标记代谢物分布、分子量分布以及 NMR 谱的细微结构等取决于两个参数 x 和 z，这些测量结果中的任何两个可用来确定未知参数 x 和 z，而其余的数据则可用来检验所得出的 x 和 z 值的一致性。实际上，一个较好的方法可能是，将全部测量结果用于对两个未知参数 x 和 z 的值的拟合，然后用残差均方值作为该拟合一致性的量度。残差均方值小则表示拟合良好，值大则意味着测量结果或假设的生化途径存在误差。倘若证明为不一致时，则可尝试每次排除一个不同的实验结果，然后检验用其余测量结果所得的拟合的一致性。如果一致性在排除一个实验结果后有明显提高，则可推测该被排除的实验结果含有过失误差，建议在拟合时不予考虑。如果没有任何一个实验结果被证明含有过失误差，则改变相应方程推导中所包含的生化途径，重复上述过程，直到获得满意的拟合为止。第四章中关于数据一致性分析的步骤可有力地用于光谱学数据和代谢数据的协调，以及准确的通量确定。最后，应注意的是，该方法依赖于所分泌代谢物或细胞裂解液中胞内代谢物的测量。不需要原位 NMR 测量和为此目的所需的安排。

显然，根据所提出的分析，可从常规 NMR 数据提取大量的信息。表 9.1～表 9.3 中表达式的可利用性使分析这样的测量结果更为方便。然而，对于所分析的生化途径的任一结构，一般并不期望获得同位素标记化合物分布的解析解。很可能的是，某些网络结构将不服从于所报道的严格解析解类型。在这种情况下，同位素标记化合物分布只能求得数值解。有助于标记转移的分析以及同位素标记化合物分布计算的合适的计算机程序在使从实验获得的信息最大化，以及提供最优的实验设计等方面将是非常有价值的（见 Schmidt et al，1997a)。这种软件也将有助于一组代谢的、光谱学的及其它的数据与代谢途径结构拟合最好的试差研究（schmidt et al，1997b)。

【例 9.3】 哺乳动物中的丙酮酸利用

前面建模概念的有效性，可通过比较模型预测值与实验数据来检验。Chance 等人 (1983) 用 90%富集的［3-^{13}C］丙酮酸注入鼠的心脏组织，得到的^{13}C-NMR 谱表明：在谷氨酸的 C-2，C-3 及 C-4 上有共振和谱线分裂（见图 9.13)。谷氨酸 C-2 共振分成 9 条谱线［中心在 55.5ppm（10^{-6}）处］，C-4 共振分成 3 条谱线［中心在 34.2ppm（10^{-6}）处］，而 C-3 共振分成 5 条谱线［集中在 27.8ppm（10^{-6}）处］。谱线分裂是由碳原子中的^{13}C-^{13}C 自旋耦合引起的。

在采用 90%富集［3-^{13}C］丙酮酸作为底物的情况下，则需推导出可能的同位素标记化合物的新分布图以及类似于表 9.1～表 9.3 中关于同位素标记化合物相对浓度的表达式。应强调的是，它们与 100%富集度时的情况是不同的。如果不把正确的丙酮酸标记考虑进去，则将会导致严重的错误。

可分别在 C-3 和 C-2 标记丙酮酸和乙酰辅酶 A，或者不标记。如果碳酸氢盐是未标记的，则由标记丙酮酸经回补反应生成的草酰乙酸将在 C-3 被标记；如果碳酸氢盐是标记的，则草酰乙酸将在 C-3 和 C-4 被标记。然而，如果碳酸氢盐是未标记的，则在草酰乙酸库中出

现的将是从未标记的丙酮酸生成的未标记草酰乙酸；如果碳酸氢盐是标记的，则出现的将是同位素标记化合物 O_4，草酰乙酸的 7 个同位素标记化合物：O、O_3、O_{34}、O_4、O_2、O_{12}及 O_1［最后 3 个是由于碳（2、3）和碳（1、4）之间的平衡而产生的］，可以在 TCA 循环中与标记的（在 C-2）和未标记的乙酰辅酶 A 缩合形成柠檬酸。在稳态下，草酰乙酸库中存在 12 种草酰乙酸同位素标记化合物：O_4、O_2、O_3、O_{34}、O_{12}、O_{23}、O_{13}、O_{24}、O_{123}和 O_{234}；相应地，谷氨酸库中存在 16 种同位素标记化合物：G、G_4、G_{14}、G_1、G_{124}、G_{12}、G_{34}、G_3、G_{24}、G_2、G_{234}、G_{23}、G_{134}、G_{13}、G_{1234}以及 G_{123}。

图 9.13 中，NMR 谱出现多重谱线形式是与关于不同同位素标记化合物种类的预测相符合的。C-2 处的 9 个谱线分裂是下列之和：由 G_{24}和 G_2 产生的一个单谱线（两条不同的单谱线叠加）、由 G_{124}和 G_{12}引起的双重谱线（耦合常数为 J_{12}）、由 G_{234}和 G_{23}引起的双重谱线

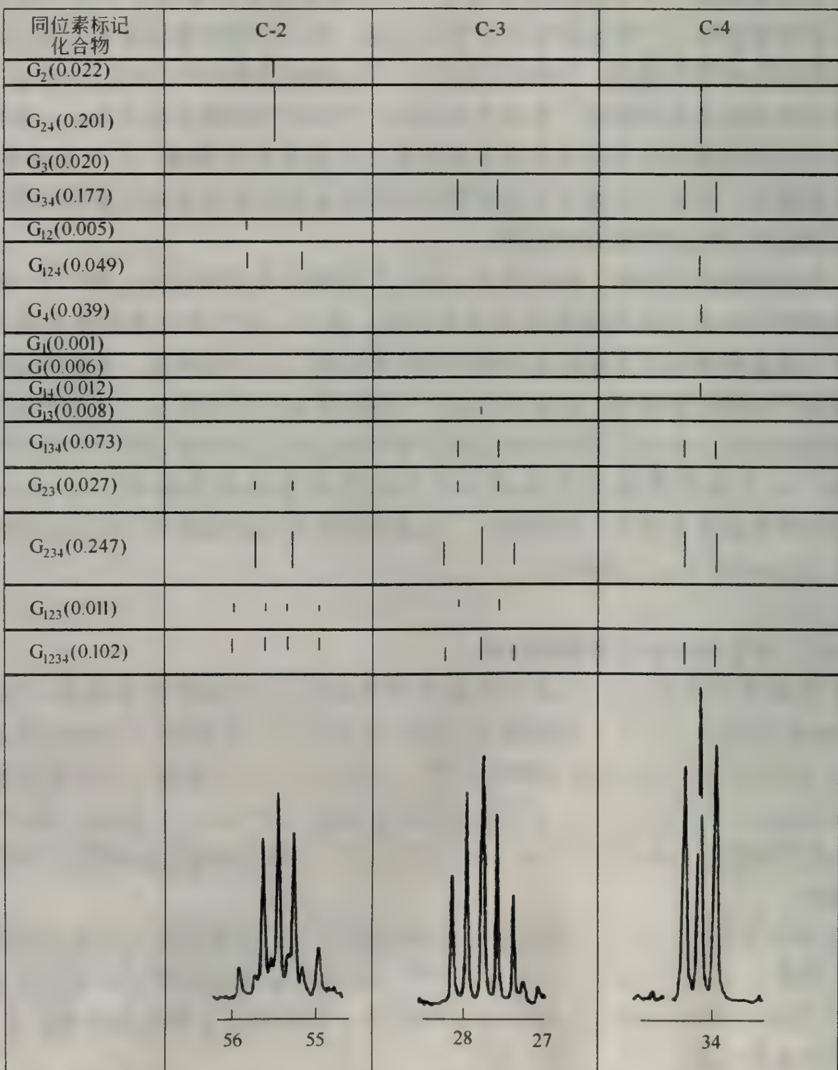


图 9.13　采用 90%［3-^{13}C］丙酮酸时观察到的谷氨酸的多重谱线形式［改自 Chance et al（1983）］
x 的值估计为 0.35。括弧中的数字为相应同位素标记化合物的相对浓度。
多重谱线中每条线的强度应是已被谱线数规范化的相对浓度

（耦合常数为 J_{23}）以及由 G_{1234}和 G_{123}引起的四重谱线。出现两个不同的双重谱线是由于耦合常数 J_{12}(53.5Hz）和 J_{23}（34.6Hz）不同。因为这种不同，由 G_{1234}和 G_{123}引起的 C-2 处的谱线分裂是四重线，而由 G_{1234}和 G_{234}引起的 C-3 处的谱线分裂是三重线。由于 J_{23}和 J_{34}的值类似，该三重线的强度比为 1∶2∶1。由于相同的原因（$J_{23}=J_{34}$），同位素标记化合物 G_{123}、G_{23}、G_{134}及 G_{34}在 C-3 处提供了相同的双重线。这样，C-3 处的 5 个谱线分裂就是下列之和：由 G_3 和 G_{13}引起的单谱线，由 G_{123}、G_{23}、G_{134}和 G_{34}引起的双重谱线，以及由 G_{1234}和 G_{234}引起的三重谱线。同样地，谱线分裂应是：C-4 处 3 条谱线，C-1 处 3 条谱线，C-5 处没有。这样，所有谷氨酸共振处的 NMR 谱细微结构与对不同谷氨酸同位素标记化合物种类的预测是相一致的。

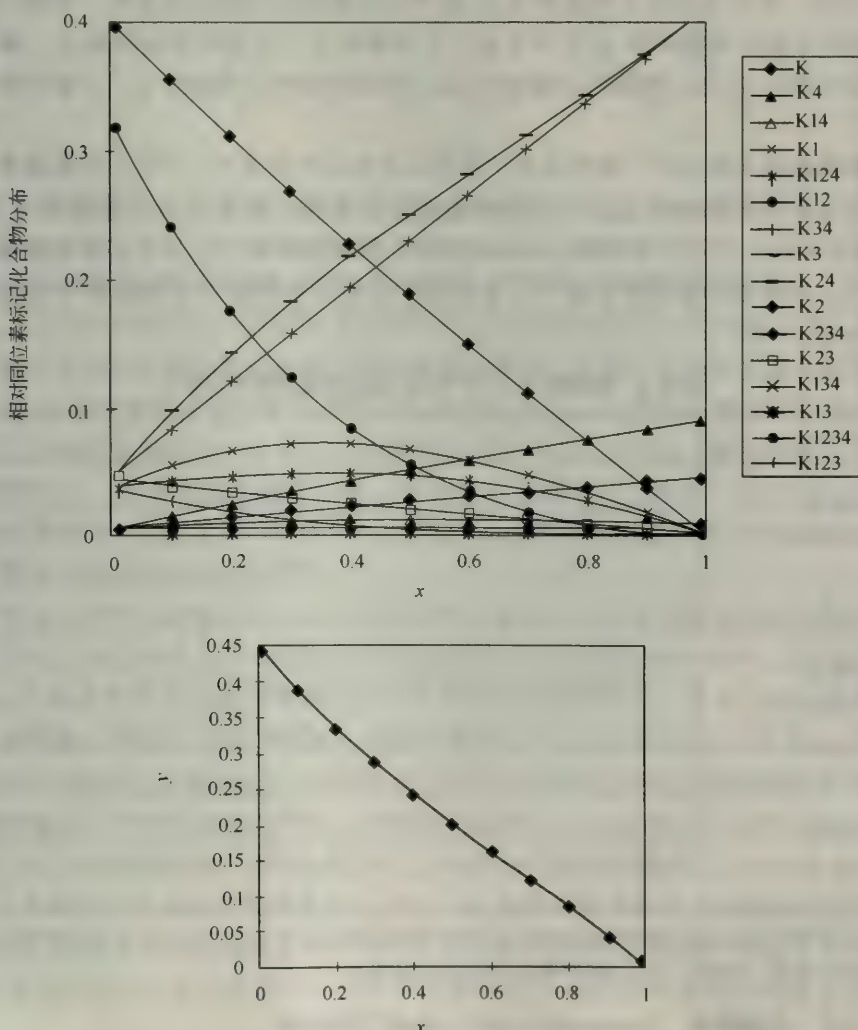


图 9.14　在 90%[3-^{13}C]丙酮酸情况下作为 x 的函数的 α-酮戊二酸同位素标记化合物的分布
存在 16 种同位素标记化合物。假设除了图 9.8 中描述的反应外，没有产生 CO_2
的反应，则 y 作为 x 的函数惟一求得

每条线的强度与同位素标记化合物浓度之和成比例，这些浓度贡献于相应谱线分裂（双重谱线、三重谱线或四重谱线）且被谱线数归一化。例如，在由 G_{124}和 G_{12}引起的 C-2 处的

双重谱线中，每条线的强度与（$[G_{124}]$ + $[G_{12}]$）/2成正比，此处 $[G_i]$ 为 G_i 的浓度。通过运用模型，从 x 的值（从 TCA 循环中出去的草酰乙酸分数）和 y 的值（固定到^{13}C 标记丙酮酸上的碳酸氢盐分数），决定 NMR 谱线强度的谷氨酸同位素标记化合物的相对分布可被惟一计算。假设除了图 9.8 中所描述的那些反应外，不存在产生 CO_2 的反应，y 值可由 x 值惟一确定。图 9.14 中显示了 16 种谷氨酸同位素标记化合物在不同 x 值时的相对浓度预测值。

由于图 9.13 中 NMR 谱线的强度可由谷氨酸同位素标记化合物的相对浓度（其本身也是分数 x 的函数）来惟一预测，因此，可从 NMR 谱的细微结构获取通量信息。谷氨酸 C-2、C-3 或 C-4 碳原子上三个共振中的任何一个都可用来确定 x，而其它两个可用来确证所得的 x 估计值。表 9.4 给出了根据图 9.13 的 NMR 谱估计出的线强度比。采用一次仅一个碳原子共振的方法时所得到的 x 值与全部三个共振时用于计算所得到的最小二乘估计值近似相等，而且等于 0.35。相应的 y 值为 0.26。表 9.4 给出了对这些 x、y 值计算所得的线强度比。

与实验数据令人满意的一致性支持了模型化方法论的有效性。C-2 上的实验数据与理论预测之间的差异可用线强度比估计中的不确定性来解释。线强度比是根据图 9.13 发表的 NMR 谱来估计的。应该注意的是，$x=0.35$ 时，算得的线强度比是在实验误差范围内。在注有［3-^{13}C］丙氨酸的鼠离体肝脏中，也得到了类似于谷氨酸和谷氨酰胺中的多重谱线模式（Hall et al，1988）。

表 9.4　根据图 9.13 中 NMR 谱的线强度确定分数 x

C-2			
NMR 谱	S/D_{12}	S/D_{23}	S/Q
	4.20±0.3	0.73±0.1	1.95±0.3
$x=0.35$	4.13	0.81	1.97
C-3			
NMR 谱	T/D		
	1.3±0.1		
$x=0.35$	1.3		
C-4			
NMR 谱	S/D		
	0.5±0.2		
$x=0.35$	0.5		

注：x 的最好估计值是 0.35。斜体的值表示对 x 的估计值计算的线强度比。S，D，T 分别为单谱线、双重谱线、三重谱线（全部三条线）的强度，D_{ij}为耦合常数为 J_{ij}的双重谱线强度。

【例 9.4】 大肠杆菌（*Escherichia coli*）中的乙酸利用

Walsh 和 Koshland（1984）从以［2-^{13}C］乙酸盐为惟一碳源生长的 *E.Coli* 得到了纯化的谷氨酸^{13}-C NMR 谱（见图 9.15），它显示了在 C-1 有一双重谱线，在 C-2 有 6 条谱线，在 C-3 有一个三重谱线以及 C-4 有一双重谱线。该模式与乙醛酸支路（模型Ⅰ）的运行是一致的，并严格符合表 9.2 的预测。

在这种情况下，只有一个变量 z，其基本上决定每个峰的以及每个峰内每条谱线的相对

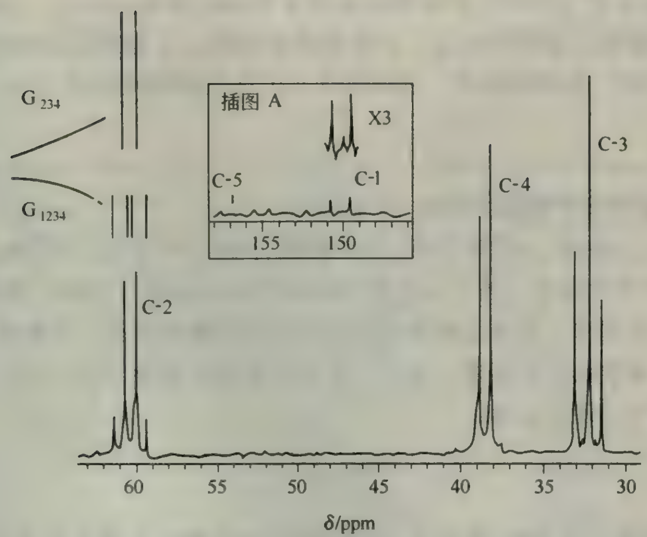


图 9.15　采用［2-^{13}C］乙酸为碳源时观测到的谷氨酸多重谱线模式

［改自 Walsh 和 Koshhand（1984）］

C-2 处的峰有 6 条谱线，包括由 G_{234}引起的一双重谱线，每条线的强度为 0.15；以及由 G_{1234}引起的一四重谱线，每条线的强度为 0.05，因此，$Q/D=2/3$。1ppm $=10^{-6}$

强度。z 被定义为经乙醛酸支路所利用异柠檬酸的概率（或者，乙醛酸支路中异柠檬酸的利用分数，TCA 循环中的转化平衡）。根据 Walsh 和 Koshland（1984）的研究，胞内谷氨酸 5 个碳原子上的相对富集度从 C-1 至 C-5 分别为 0.4∶1.0∶0.9∶1.0∶0。模型预测 C-2＝C-3＝C-4＝1，而 C-5＝0，完全与实验结果一致，而 C-1＝$(1-z)/2$。将 C-1 的实验值 0.4 代入该式，可求得 z 等于 0.2。这与 Walsh 和 Koshland（1984）应用基于中间代谢物碳输入-输出平衡的复杂方法所估计的值相同。

由于考虑了中间代谢物的所有同位素标记化合物而不仅仅是在特定代谢物碳位的同位素富集度，因此，模型结果也可准确地解释所获得的 NMR 谱的细微结构。即使标记示意图（见图 9.11）显示有多达 6 种 α-酮戊二酸同位素标记化合物存在，表 9.2 的结果表明，在稳态下，只有两种 α-酮戊二酸应当存在：相对浓度为 $(1-z)/2$的 K_{1234}（或 G_{1234}）和相对浓度为 $(1+z)/2$的 K_{234}（或 G_{234}）。可用类似于 9.2.1 节中［3-^{13}C］丙酮酸情况的方式来分析多重谱线模式。特别有趣的是 C-2 处的模式。这时，G_{1234}应在 C-2 处产生每条线强度为 $(1-z)/8=0.1$ 的四重谱线，而 G_{234}应在 C-2 处产生每条线强度为 $(1+z)/4=0.3$ 的双重谱线。C-2 共振的各个峰缺少强度数据，因此，这些预测值不能直接与图 9.15 的结果进行比较。然而，比较各个峰的高度，可以看出，实验值与预测值一般是一致的。同样也可分析 C-3、C-4 共振的强度，虽然它们没有包含有关通量比 z 值的任何信息，但非常符合前面的模式。

证实细菌中的乙醛酸支路运行的另一个实验是用 99%［1-^{13}C］乙酸进行的。在这种情况下，也可根据 z 来求得谷氨酸的同位素标记化合物种类。应只有两种出现（见表 9.3）：相对浓度分别为$(1+z)/2$ 和$(1-z)/2$ 的G_5 和 G_{15}。因此，谷氨酸的富集度应是C-1 为$(1-z)/2$、C-5 为 1，C-2，C-3，C-4 没有。这恰恰是在 *E.coli* 中的脯氨酸合成（Crawford et al, 1987）以及在 *Brevibacterium flavum* 中的谷氨酸合成（Walker 和 London，1987）中观测

到的。由于 Crawford 等（1987）所采用的系统与 Walsh 和 Koshland（1985）所采用的系统类似，因此，可以假设 z 值都为 0.2，从而得出谷氨酸 C-1 富集度的估计值为 0.40。根据 Crawford 等人（1987）报道的波谱，可以估计 C-1 谷氨酸富集度为 30%，与模型预测还是相当一致的。

【例 9.5】 细菌中的乙醛酸支路与 TCA 循环

z 的值表示经乙醛酸支路转化的异柠檬酸分数，可通过三个涉及运用 GC-MS 和 ^{13}C NMR 的独立方法来确定。第一，正如 Walsh 和 Koshlad（1984）所做的，可以使用谷氨酸 C-1 处的相对富集度。该方法要求对已知标准进行额外测量，以便建立将绝对峰强度转换为相对富集度所要求的校正标准。第二，在 C-2 峰内，四重谱线（Q）与双重谱线（D）的比可用来根据表 9.3 确定 z 值。

$$\frac{Q}{D}=\frac{1-z}{1+z} \tag{1}$$

图 9.15 已给出，比值（Q/D）为 2/3，由此用式（1）得出 z 等于 0.2，该结果与按方法一得到的结果相同。第三，GC-MS 可用来测量具有不同分子量（相差一个原子质量单位）的同一代谢物的分数。在 Walsh 和 Koshland（1984）的例子中，GC-MS 应对谷氨酸产生两个峰，一个对应于分子量（$M+3$），而另一个对应于（$M+4$），此处 M 表示所有碳原子都为 ^{12}C 的谷氨酸的分子量。谷氨酸同位素标记化合物 G_{234} 的分子量为（$M+3$）、G_{1234} 的分子量为（$M+4$），因此（$M+3$）与（$M+4$）之比为

$$\frac{M+3}{M+4}=\frac{1+z}{1-z} \tag{2}$$

类似地，在采用［1-^{13}C］乙酸盐情况下，z 的值可通过两种不同的方法求得：根据 ^{13}C NMR 测量的每个碳原子的相对富集度，以及根据 GC-MS 测量的($M+2$)与($M+1$)之比。

9.3 碳平衡

在大代谢网络中，详尽列出所有的同位素标记代谢物是很困难的。当缺少有关同位素标记化合物的分子量或 NMR 细微结构的信息时，这简直是不必要的。通常，仅仅总的同位素富集度（或强度）连同同位素标记实验一起测量，而且在不增加全部同位素标记化合物列举和平衡的复杂性情况下，也可分析这些数据。在这一节里，将阐述直接使用代谢物碳平衡和原子作图矩阵来分析同位素强度数据的两个方法。

9.3.1 直接碳平衡

由于该方法包括总代谢物平衡以及网络代谢物的每个碳原子的平衡，因此，它是相当直接明了的。这样对每个碳原子的命运都作了解释，而且也可确定某个代谢物的特定碳原子的富集度。我们将通过在戊糖磷酸途径（PPP）上的应用来说明这个方法。

图 9.16 所示为描述戊糖磷酸途径的示意。正如第二章中提到的，PPP 有一条氧化支路，其起始于 Glc6P（6-磷酸葡萄糖）的脱氢，首先形成 6-磷酸葡萄糖酸，然后经过两个以上的反应，形成 5-磷酸核糖，用于 RNA 和 DNA 核苷酸糖的生物合成。

$$-\text{Glc6P}-2\text{NADP}^{+}-H_2O+\underset{\text{(5-磷酸核糖)}}{\text{ribose-5-phosphate}}+2\text{NADPH}+2H^{+}+CO_2=0$$

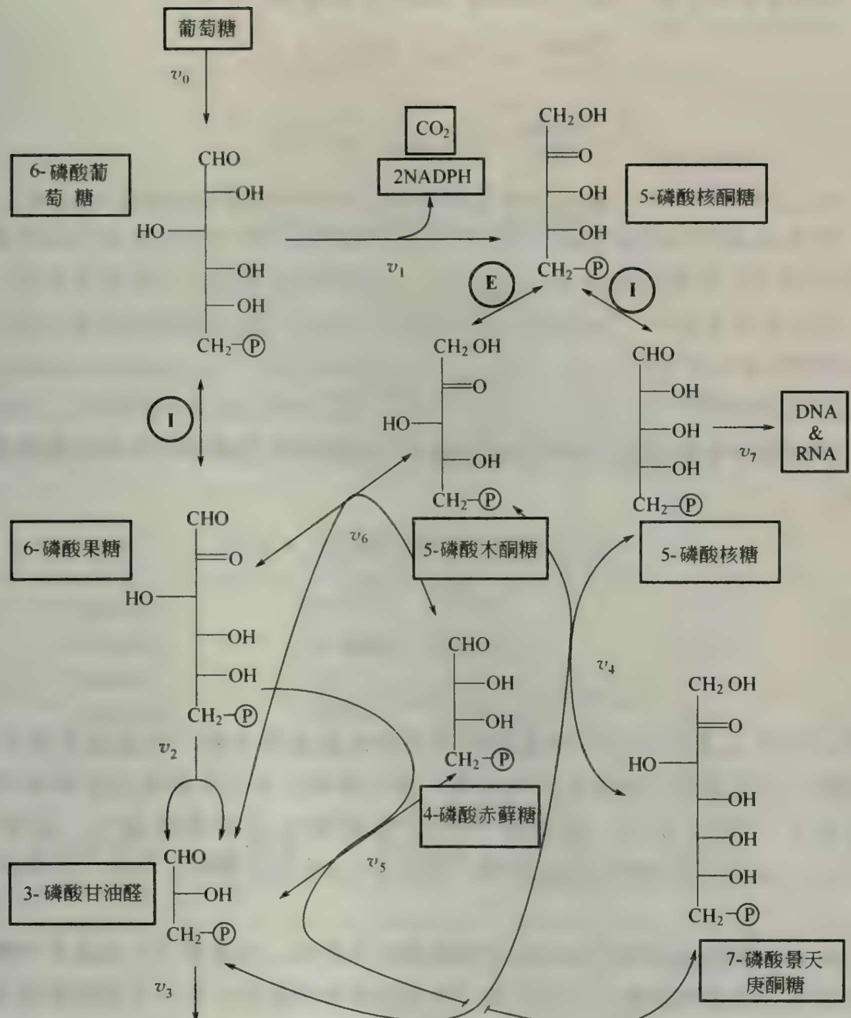


图 9.16 具有独立碳原子图例的戊糖磷酸途径

由于大多数细胞需求 NADPH 比 5-磷酸核糖多，因此，过量的核糖可通过转酮酶和转醛酶作用下的酮糖单位和醛糖单位转移而又转化回来成为糖酵解中间产物。PPP 的非氧化支路的净总和为：

$$-3(\text{ribose-5-phosphate}) + 2(\underset{(6\text{-磷酸果糖})}{\text{fructose-6-phosphate}}) + \underset{(3\text{-磷酸甘油醛})}{\text{glyceraldehyde-3-phosphate}} = 0$$

PPP 反应的化学计量在也总结在表 10.1 中。通过中心碳代谢的通量分析要求准确计算 PPP 中碳被氧化的数量，以及所产生的用于细胞生物合成的还原力。正如 10.1 节中证实的一样，总物质平衡可以给出通过该途径的净通量估计值以及 PPP 与糖酵解途径之间的通量分布。然而，获得对通量分配比（通过物质平衡确定）以及 PPP 关键反应（即转酮酶反应和转醛酶反应）的可逆性程度的估计的独立确认是非常需要的。如下所示，这可以通过标记葡萄糖的引入以及所选 PPP 中间代谢物的同位素强度测量来实现。

首先，从图 9.16 中代谢物库的平衡开始。应注意的是，6-磷酸葡萄糖与 6-磷酸果糖之间的异构酶反应以及戊糖磷酸库之间的异构酶和差向异构酶反应是很快的，并假设处于平衡

态，因此，将网络中的己糖（H6P）和戊糖（R5P）设想为一个单一库：

$$\frac{\mathrm{d}c_{\mathrm{H6P}}}{\mathrm{d}t}=v_0-v_1-v_2+v_5+v_6 \tag{9.31a}$$

$$\frac{\mathrm{d}c_{\mathrm{R5P}}}{\mathrm{d}t}=v_1-2v_4-v_6-v_7 \tag{9.31b}$$

$$\frac{\mathrm{d}c_{\mathrm{G3P}}}{\mathrm{d}t}=2v_2-v_3+v_4-v_5+v_6 \tag{9.31c}$$

$$\frac{\mathrm{d}c_{\mathrm{E4P}}}{\mathrm{d}t}=v_5-v_6 \tag{9.31d}$$

$$\frac{\mathrm{d}c_{\mathrm{S7P}}}{\mathrm{d}t}=v_4-v_5 \tag{9.31e}$$

在稳态下，若假设用于核苷酸合成的戊糖磷酸库的消耗可以忽略不计，则上述等式可简化为下列关系式：

$$v_1=3xv_0 \tag{9.32a}$$

$$v_2=(1-x)v_0 \tag{9.32b}$$

$$v_3=(2-x)v_0 \tag{9.32c}$$

$$v_4=v_5=v_6=xv_0 \tag{9.32d}$$

上述等式中的 x 值表示进入戊糖磷酸途径的己糖通量分数。代谢物平衡仅指通过该途径的总通量，还没考虑可逆性的任何度量。可以看出，通过非氧化反应途径的净通量是相等的，并且当 x 等于 1 时，所有输入的己糖都流经戊糖磷酸途径。这样，根据式(9.32c)，$v_3=v_0$，而且每消耗 1mol 己糖，就产生 1mol 的丙酮酸。结果，己糖的一半释放为 CO_2。

当然，前面的模型也可通过引入标记葡萄糖作为底物，并测量一个或几个戊糖磷酸途径中间代谢物的标记分布来检验。为了有助于解释这种标记数据，必须写出代谢物碳平衡式以描述网络中所考虑的每个碳原子的总平衡。这些平衡在表 9.5 中给出，对应于图 9.17 中关于戊糖磷酸途径（PPP）非氧化反应的碳转移图式。进一步注意到，对于每个 PPP 非氧化反应，假设是完全可逆的，因此，每个净反应是正反应（v_i^+）和逆反应（v_i^-）的复合。按惯例，正反应和逆反应都用正号来表示。净反应的符号（由正、逆反应的相对大小决定）表示净通量是正反应方向（正号），还是逆反应方向（负号）。由于与糖酵解中间产物进行的碳原子交换，反应可逆性可导致标记进一步重新分布，而且必须为全面说明同位素标记模式而考虑。对戊糖磷酸途径三个非氧化性反应可逆性的考虑需要三个额外的未知量来描述这种可逆性程度，或交换速率 ζ_i。对于一个正的净反应速率，ζ_i 就定义为正反应速率与净通量之差：$\zeta_i=v_i^+-v_i=v_i^-$。由于交换速率直接影响中间代谢物的标记模式，因此它们是很重要的。此外，当产生从总代谢物平衡决定的相同净通量时，它们可以发生很显著变化。对前面 3 个反应引入交换速率，使得表 9.5 的方程中的所有反应速率可表示为净 PPP 通量（等于 xv_0）和 3 个交换速率的函数：

$$v_4^+=(xv_0+\zeta_4) \tag{9.33a}$$

$$v_4^-=\zeta_4 \tag{9.33b}$$

$$v_5^+ = (xv_0 + \zeta_5) \tag{9.33c}$$

$$v_5^- = -\zeta_5 \tag{9.33d}$$

$$v_6^+ = (xv_0 + \zeta_6) \tag{9.33e}$$

$$v_6^- = -\zeta_6 \tag{9.33f}$$

显然，净 PPP 通量和交换速率的确定需要测量标记分布。有很多识别方法可用于这种确定。最简单的方法是如图 9.7 所示的试差法，它是以 PPP 通量和交换速率的一些初始推测值开始，通过求解表 9.5 的线性方程组，从而对一给定的标记底物（己糖）确定标记分布。通过与同位素强度测量值进行比较，重新调整初始推测值，并重复计算过程，直到收敛为止。Mathematica 或 Maple 中的标准程序可用来求解。采用该方法时应记住两点。第一，这实质上是对一个非线性代数方程组进行求解的问题。因此，它可能对解的初值敏感。第二，测量强度的选择是最终解质量的关键，或甚至完全是得到解的关键。这一点将进一步详细说明。

表 9.5　戊糖磷酸途径的代谢物碳平衡

$$\frac{d[\mathrm{H6P}]}{dt} = v_0\begin{pmatrix}\mathrm{Hexose}(1)\\ \mathrm{Hexose}(2)\\ \mathrm{Hexose}(3)\\ \mathrm{Hexose}(4)\\ \mathrm{Hexose}(5)\\ \mathrm{Hexose}(6)\end{pmatrix} - (v_1+v_2)\begin{pmatrix}\mathrm{H6P}(1)\\ \mathrm{H6P}(2)\\ \mathrm{H6P}(3)\\ \mathrm{H6P}(4)\\ \mathrm{H6P}(5)\\ \mathrm{H6P}(6)\end{pmatrix} + v_5^+\begin{pmatrix}\mathrm{S7P}(1)\\ \mathrm{S7P}(2)\\ \mathrm{S7P}(3)\\ \mathrm{G3P}(1)\\ \mathrm{G3P}(2)\\ \mathrm{G3P}(3)\end{pmatrix} - (v_5^- + v_6^-)\begin{pmatrix}\mathrm{H6P}(1)\\ \mathrm{H6P}(2)\\ \mathrm{H6P}(3)\\ \mathrm{H6P}(4)\\ \mathrm{H6P}(5)\\ \mathrm{H6P}(6)\end{pmatrix} + v_6^+\begin{pmatrix}\mathrm{R5P}(1)\\ \mathrm{R5P}(2)\\ \mathrm{E4P}(1)\\ \mathrm{E4P}(2)\\ \mathrm{E4P}(3)\\ \mathrm{E4P}(4)\end{pmatrix}$$

$$\frac{d[\mathrm{R5P}]}{dt} = v_1\begin{pmatrix}\mathrm{H6P}(2)\\ \mathrm{H6P}(3)\\ \mathrm{H6P}(4)\\ \mathrm{H6P}(5)\\ \mathrm{H6P}(6)\end{pmatrix} - 2v_4^+\begin{pmatrix}\mathrm{R5P}(1)\\ \mathrm{R5P}(2)\\ \mathrm{R5P}(3)\\ \mathrm{R5P}(4)\\ \mathrm{R5P}(5)\end{pmatrix} + v_4^-\begin{pmatrix}\mathrm{S7P}(1)\\ \mathrm{S7P}(2)\\ \mathrm{G3P}(1)\\ \mathrm{G3P}(2)\\ \mathrm{G3P}(3)\end{pmatrix} + v_4^-\begin{pmatrix}\mathrm{S7P}(3)\\ \mathrm{S7P}(4)\\ \mathrm{S7P}(5)\\ \mathrm{S7P}(6)\\ \mathrm{S7P}(7)\end{pmatrix} - v_6^+\begin{pmatrix}\mathrm{R5P}(1)\\ \mathrm{R5P}(2)\\ \mathrm{R5P}(3)\\ \mathrm{R5P}(4)\\ \mathrm{R5P}(5)\end{pmatrix} + v_6^-\begin{pmatrix}\mathrm{H6P}(1)\\ \mathrm{H6P}(2)\\ \mathrm{G3P}(1)\\ \mathrm{G3P}(2)\\ \mathrm{G3P}(3)\end{pmatrix}$$

$$\frac{d[\mathrm{G3P}]}{dt} = v_2\begin{pmatrix}\mathrm{H6P}(3)\\ \mathrm{H6P}(2)\\ \mathrm{H6P}(1)\end{pmatrix} + v_2\begin{pmatrix}\mathrm{H6P}(4)\\ \mathrm{H6P}(5)\\ \mathrm{H6P}(6)\end{pmatrix} + v_4^+\begin{pmatrix}\mathrm{R5P}(3)\\ \mathrm{R5P}(4)\\ \mathrm{R5P}(5)\end{pmatrix} - (v_4^- + v_5^+ + v_6^- + v_3)\begin{pmatrix}\mathrm{G3P}(1)\\ \mathrm{G3P}(2)\\ \mathrm{G3P}(3)\end{pmatrix} + v_5^-\begin{pmatrix}\mathrm{H6P}(4)\\ \mathrm{H6P}(5)\\ \mathrm{H6P}(6)\end{pmatrix} + v_6^+\begin{pmatrix}\mathrm{R5P}(3)\\ \mathrm{R5P}(4)\\ \mathrm{R5P}(5)\end{pmatrix}$$

$$\frac{d[\mathrm{E4P}]}{dt} = v_5^+\begin{pmatrix}\mathrm{S7P}(4)\\ \mathrm{S7P}(5)\\ \mathrm{S7P}(6)\\ \mathrm{S7P}(7)\end{pmatrix} - (v_5^- + v_6^+)\begin{pmatrix}\mathrm{E4P}(1)\\ \mathrm{E4P}(2)\\ \mathrm{E4P}(3)\\ \mathrm{E4P}(4)\end{pmatrix} + v_6^-\begin{pmatrix}\mathrm{H6P}(3)\\ \mathrm{H6P}(4)\\ \mathrm{H6P}(5)\\ \mathrm{H6P}(6)\end{pmatrix}$$

$$\frac{d[\mathrm{S7P}]}{dt} = v_4^+\begin{pmatrix}\mathrm{R5P}(1)\\ \mathrm{R5P}(2)\\ \mathrm{R5P}(1)\\ \mathrm{R5P}(2)\\ \mathrm{R5P}(3)\\ \mathrm{R5P}(4)\\ \mathrm{R5P}(5)\end{pmatrix} - (v_4^- + v_5^+)\begin{pmatrix}\mathrm{S7P}(1)\\ \mathrm{S7P}(2)\\ \mathrm{S7P}(3)\\ \mathrm{S7P}(4)\\ \mathrm{S7P}(5)\\ \mathrm{S7P}(6)\\ \mathrm{S7P}(7)\end{pmatrix} + v_5^-\begin{pmatrix}\mathrm{H6P}(1)\\ \mathrm{H6P}(2)\\ \mathrm{H6P}(3)\\ \mathrm{E4P}(1)\\ \mathrm{E4P}(2)\\ \mathrm{E4P}(3)\\ \mathrm{E4P}(4)\end{pmatrix}$$

注：Hexose—己糖。

本节概述的方法曾被用来分析［2-^{14}C］葡萄糖和胰岛素（或没有胰岛素）培养的鼠表皮脂肪组织中糖原的^{14}C 标记分布（Landau and Katz，1964）。表 9.6 给出了相对于 C-2 的糖原（H6P）碳原子的比活性以及用上述模型和求解步骤计算的结果。为模型预测设置了两项：一项为假设 3 个 PPP 反应没有可逆性，另一项为完全可逆。可以看出，模型预测值与测量强度之间的一致性是后者比较好，后者也给出了可逆反应的交换速率估计值。表 9.7 总结了对赖氨酸生产菌 *C.glutamicum* 戊糖磷酸途径类似研究的结果（Marx et al，1996）。此外，假设反应没有可逆会对 4-磷酸赤藓糖（E4P）、磷酸甘油醛（G3P）及其它产物的碳富集度预测值产生过失误差。这可通过计入交换速率来校正，并使标记富集度预测值和测量值之间产生良好的一致性。这里应当注意，仅使用 E4P 富集度数据并不足以允许可逆反应交换速率的稳健确定。这可通过引入 5-磷酸核糖富集度数据来校正（特别是通过从细胞材料中分离的鸟苷衍生物而测量的 C-1 富集度），5-磷酸核糖富集度数据可以很明显地将一个未确定的系统转换为已确定的系统。磷酸甘油醛富集度可用来代替 R5P，这意味着有好几种富集度测量的组合，它们产生于一个可观测的系统。类似地，对于表 9.6 的糖原结果，如果用 G3P（通过乳酸所测量）来代替糖原，则将产生一个未确定的系统。

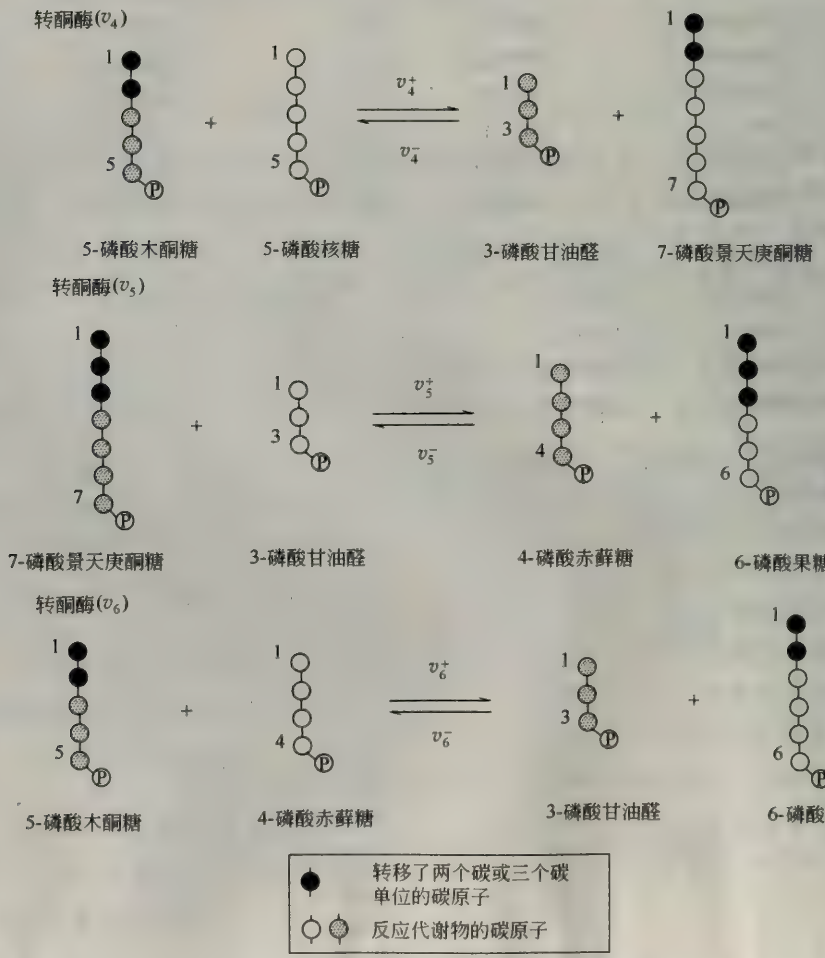


图 9.17　磷酸戊糖途径反应中的碳转移示意

表 9.6　来自 [2-^{14}C] 葡萄糖的 H6P 的^{14}C 标记数据

项　目	H6P	C-1	C-2	C-3	C-4	C-5	C-6
试验的比活性^{14}C	Ins^-	15.2	100	12.8	1.9	13.9	2.9
	Ins^+	30.7	100	17.9	3.5	14.8	5.3
模型:没有可逆性	Ins^-	20.6	100	11.5	0.6	5.4	1.1
	Ins^+	31.5	100	18.7	1.5	8.1	2.5
模型:可逆	Ins^-	18.8	100	15.8	2.1	13.4	2.5
	Ins^+	30.5	100	20.9	2.7	13.1	4.0

注：实验值与假设转酮酶反应和转醛酶反应没有可逆性和有可逆性的模型预测值进行比较（Landau and Katz，1964）。计算中采用 $x_{Ins^-}=0.13$ 和 $x_{Ins^+}=0.23$。对于具有可逆性的模型，在没有或存在胰岛素的情况下分别采用下列参数：$\zeta_4=0.5$，$\zeta_5=0.2$，$\zeta_6=0$ 和 $\zeta_4=0.8$，$\zeta_5=0.08$，$\zeta_6=0$。

表 9.7　在以 [1-^{13}C] 葡萄糖为底物的恒化器培养中，*Corynebacterium glutamicum* 中的 4-磷酸赤藓糖（Ery4P）和 3-磷酸甘油醛（G3P）的^{13}C 富集度的测量值和估计值

方　法	代谢物	在不同 C 位上^{13}C 富集度			
		C1	C2	C3	C4
实验	Ery4P	2.5%	2.0%	1.9%	15.3%
	G3P	2.7%	2.6%	26.3%	—
模型 1 $\xi_4=\xi_5=\xi_6=0$	Ery4P	0.0%	0.0%	0.0%	5.2%
	G3P	0.0%	0.0%	32.4%	
模型 2 $\xi_4=0.5,\xi_5=0.1,$ $\xi_6=0.2$	Ery4P	3.7%	0.9%	0.3%	15.6%
	G3P	1.9%	0.6%	31.0%	

注：实验值与假设转酮酶反应和转醛酶反应没有可逆性（模型 1）和有可逆性（模型 2）的模型预测值进行比较 [Marx et al，(1996)，Follstad and Stephanopoulos (1998)]。

9.3.2　原子作图矩阵的应用

对同位素分布建模的另一个方法可避免常规分析的几个缺点，而且特别适用于大代谢网络。在这个方法中，原子作图矩阵（AMMs）被用来描述碳原子从反应物到产物的转移(Zupke and Stephanopoulos，1994)。AMMs 使生化网络的细节从控制同位素分布的稳态方程建立中得到解耦。得到的方程式易于推导、修改及求解。AMMs 的方法特别适合于数据库开发、大代谢网络的应用以及试差的情况，这里每次迭代后网络结构要修改。将通过使用图 9.5 中的简单生化网络来介绍该方法。

第一步是以向量形式表示每个代谢物碳原子的比活性（即富集度）。一个代谢物向量的第 n 个元素含有第 n 个碳的比活性。对于图 9.5 中的反应网络，建立下列代谢物向量：

$$\mathrm{Pyr}=\begin{pmatrix}\mathrm{Pyr}(1)\\ \mathrm{Pyr}(2)\\ \mathrm{Pyr}(3)\end{pmatrix};\quad \mathrm{AcCoA_I}=\begin{pmatrix}\mathrm{AcCoA_I}(1)\\ \mathrm{AcCoA_I}(2)\end{pmatrix} \tag{9.34}$$

$$\mathrm{Hex}=\begin{pmatrix}\mathrm{Hex}(1)\\ \mathrm{Hex}(2)\\ \mathrm{Hex}(3)\\ \mathrm{Hex}(4)\\ \mathrm{Hex}(5)\\ \mathrm{Hex}(6)\end{pmatrix};\quad \mathrm{AcCoA_{II}}=\begin{pmatrix}\mathrm{AcCoA_{II}}(1)\\ \mathrm{AcCoA_{II}}(2)\end{pmatrix} \tag{9.35}$$

采用向量符号，一个代谢物的所有碳原子可以清楚而又简洁的形式表示。

下一步是对代谢网络中的反应构建原子作图矩阵。这些矩阵描述原子从反应物至产物的转移。对于每个反应，每个反应物-产物对将有一个作图矩阵。例如，考虑包括两个反应物 A 和 B，两个产物 C 和 P，并由酶 E 催化的一个普通反应：

$$A+B \overset{E}{\longleftrightarrow} C+D \tag{9.36}$$

该反应将有 4 个作图矩阵描述碳原子从 A 到 C、A 到 D、B 到 C 及 B 到 D 的转移。用带有下标为酶名（或反应名）的方括号来表示每个反应的作图矩阵，方括号内表示的是特定的反应物-产物对，并用一个符号＞分开（以表示方向）。这样，反应样本中的 4 个作图矩阵如下：

$[A>C]_E$ 描述碳原子从 A 到 C 的转移

$[A>D]_E$ 描述碳原子从 A 到 D 的转移

$[B>C]_E$ 描述碳原子从 B 到 C 的转移

$[B>D]_E$ 描述碳原子从 B 到 D 的转移

原子作图矩阵这样构建，使得反应物的比活性向量与 AMM 的乘积可以详细说明反应物对产物比活性向量的贡献。所得产物的比活性是每个反应物的贡献之和：

$$[A>C]_E A+[B>C]_E B=C \tag{9.37}$$

$$[A>D]_E A+[B>D]_E B=D \tag{9.38}$$

作图矩阵的维数是由反应物-产物对中的碳原子数决定。列数等于反应物中的碳原子数，而行数等于产物中的碳原子数。作图矩阵第 i 行和第 j 列的元素说明反应物第 j 个碳衍生为产物第 i 个碳的数量。通常，反应物碳到产物碳的作图是有限的和惟一的，因此，作图矩阵的元素通常为 0 或 1。但分数元素也是可能的。

返回到样本代谢网络，并对该系统构建作图矩阵，反应 1 是由丙酮酸脱氢酶（PDH）催化的，丙酮酸为惟一反应物，$AcCoA_{I}$ 和 CO_2 为两个产物。在这个分析中，不把 CO_2 作为可测量的代谢物计入，因此，只需要一个作图矩阵：$[Pyr>AcCoA_{I}]_{PDH}$。可知，丙酮酸的第 1 个碳原子转化为 CO_2，而第 2、3 个碳原子分别转化为 $AcCoA_{I}$ 的第 1、2 碳原子，这就得到下面的作图矩阵。

$$[Pyr>AcCoA]_{PDH}=\begin{pmatrix}0 & 1 & 0\\ 0 & 0 & 1\end{pmatrix} \tag{9.39}$$

如果 $AcCoA_{I}$ 只从丙酮酸衍生出，则它的比活性将由下式给定：

$$\begin{aligned}[Pyr>AcCoA_{I}]_{PDH}Pyr &= \begin{pmatrix}0 & 1 & 0\\ 0 & 0 & 1\end{pmatrix}\begin{pmatrix}Pyr(1)\\ Pyr(2)\\ Pyr(3)\end{pmatrix}=\begin{pmatrix}Pyr(2)\\ Pyr(3)\end{pmatrix}\\ &=\begin{pmatrix}AcCoA_{I}(1)\\ AcCoA_{I}(2)\end{pmatrix}=AcCoA_{I}\end{aligned} \tag{9.40}$$

然而，在库 I 和库 II 之间也存在 AcCoA 的转移，因此，式（9.40）不能完全确定 $AcCoA_{I}$ 的比活性。

反应 2 为 AcCoA 从库 I 至库 II 的运输，并用 trans I 表示。而反应 3 为 AcCoA 从库 II 至库 I 的运输，并用 trans II 表示。由于 $AcCoA_{I}$ 和 $AcCoA_{II}$ 中的碳原子可直接相互作图，因此，$[AcCoA_{I}>AcCoA_{II}]_{trans\,I}$ 和 $[AcCoA_{II}>AcCoA_{I}]_{trans\,II}$ 都是 2×2 单位矩阵：

$$[AcCoA_{Ⅰ} > AcCoA_{Ⅱ}]_{trans\,Ⅰ} = [AcCoA_{Ⅱ} > AcCoA_{Ⅰ}]_{trans\,Ⅱ} = \begin{pmatrix} 1 & 0 \\ 0 & 1 \end{pmatrix} \tag{9.41}$$

终反应是反应 5，即己酸氧化为 $AcCoA_{Ⅱ}$，用 βox 表示，有一个原子作图矩阵。己酸的 β-氧化成对移去碳原子而生成 3 个 AcCoA 分子。己酸的奇数碳原子因转化为 $AcCoA_{Ⅱ}$ 难以区分，因此，它们在矩阵 $[Hex > AcCoA_{Ⅰ}]_{\beta ox}$ 中的系数为 1/3，并且对偶数碳原子也是如此。将奇、偶数碳原子分别对 $AcCoA_{Ⅱ}$ 的碳 1，碳 2 作图，得到：

$$[Hex > AcCoA_{Ⅱ}]_{\beta ox} = \begin{pmatrix} \frac{1}{3} & 0 & \frac{1}{3} & 0 & \frac{1}{3} & 0 \\ 0 & \frac{1}{3} & 0 & \frac{1}{3} & 0 & \frac{1}{3} \end{pmatrix} \tag{9.42}$$

所有必需的原子作图矩阵构已经建好并可用来建立稳态同位素平衡式。进入一个代谢物的标记通量仅仅是作图矩阵与反应物比活性向量用相应的反应通量加权后的乘积之和。对于 $AcCoA_{Ⅰ}$，两个有贡献的反应是通量为 v_1 的 PDH 以及通量为 v_2 的 transⅡ：

进入 $AcCoA_{Ⅰ}$ 的通量：

$$v_1[Pyr > AcCoA_{Ⅰ}]_{PDH}Pyr + v_3[AcCoA_{Ⅱ} > AcCoA_{Ⅰ}]_{trans\,Ⅱ}AcCoA_{Ⅱ} \tag{9.43}$$

流出 $AcCoA_{Ⅰ}$ 的标记通量：

$$(v_2 + v_4)AcCoA_{Ⅰ} \tag{9.44}$$

两式［式（9.43）和式（9.44）］相等得出 $AcCoA_{Ⅰ}$ 的稳态同位素平衡：

$$(v_2 + v_4)AcCoA_{Ⅰ} = v_1[Pyr > AcCoA_{Ⅰ}]_{PDH}Pyr + v_3[AcCoA_{Ⅱ} > AcCoA_{Ⅰ}]_{trans\,Ⅱ}AcCoA_{Ⅱ} \tag{9.45}$$

类似地，$AcCoA_{Ⅱ}$ 的稳态同位素平衡为

$$(v_3 + v_6)AcCoA_{Ⅱ} = v_2[AcCoA_{Ⅰ} > AcCoA_{Ⅱ}]_{trans\,Ⅰ}AcCoA_{Ⅰ} + v_5[Hex > AcCoA_{Ⅱ}]_{\beta ox}Hex \tag{9.46}$$

式（9.45）和式（9.46）等价于例 9.2 的式（3）、式（4）、式（7）和式（8），它们是通过分别处理每个原子而得出的。在像本例这类小网络中，这两种方法的复杂程度是相同的。然而，对于较大网络，特别是那些很多代谢物具有 3 个以上碳原子的网络，构建原子作图矩阵和以矩阵形式列出稳态平衡式将得到更具代表性的简洁方程组。此外，如果有关碳原子从反应物到产物的转移方式的新信息可以获取，则只要改变描述受影响反应的原子作图矩阵即可。这是相当直接的，而且不需新的代数学。

通过使用原子作图矩阵描述代谢网络中同位素分布的方程组可借助计算机迭代求解。这要求对底物碳原子的比活性设置初始值（对于分数富集度，则设置为 0～1 之间的值），并提供一组一致的通量值。然后，按序求解每个稳态方程，得到输出代谢物的活性，重复此过程，直到达到收敛为止。本质上，这等价于用 Gauss-Seidel 方法求解 $\mathbf{As} = \mathbf{b}$。所有矩阵都是小的，而且不需矩阵变换。因此，即使对非常大的生化反应该方法在计算上并不需要费很大功夫。

类似于原子作图矩阵，也可以构建同位素标记化合物作图矩阵来描述生化反应中的同位素标记化合物的转化。当要分析复杂代谢网络时，这些矩阵与同位素标记化合物分布向量都是非常有用的，但本书将不处理这些复杂网络，而且仅提及 Schmidt 等人（1997a，b）的研究。对于怎样构建这些矩阵，以及在分析复杂代谢网络方面的应用，Schmidt 给出了详细的叙述。

参 考 文 献

Annison, E. F., Leng, R. A., Lindsay, D. B., & White, R. R. (1963). The metabolism of acetic acid, propionic acid and butyric acid in sheep. *Biochem. J*. **88**: 248-252.

Blum, J. J. & Stein, R. B. (1982). On the analysis of metabolic networks. *In Biological Regulation and Development* pp. 99-125. Edited by R. F. Goldenberger & K. R. Yamamoto. New York: Plenum Press.

Chance, E. M., Seeholzer, S. H., Kobayashi, K. & Williamson, J. R. (1983). Mathematical analysis of isotope labeling in the citric acid cycle with applications to ^{13}C NMR studies in perfused rat hearts. *Journal of Biological Chemistry* **258**, 13785-13794.

Crawford, A., Hunter, B. K. & Wood, J. M. (1987). Nuclear Magnetic Resonance spectroscopy reveals the metabolic origins of proline excreted by an *Escherichia coli* derivative during growth on [13C] acetate. *Applied and Environmental Microbiology* **53**: 2445-2451.

Desmoulin, F., Canioni, P. & Cozzone, P. J. (1985). Glutamate-glutamine metabolism in the perfused rat liver: 13C-NMR study using (2-13C)-enriched acetate. *FEBS. Letters* **185**: 29-32.

Follstad, B. D. & Stephanopoulos, G. (1998). Effect of reversible reactions on isotope label distributions. Analysis of the pentose phosphate pathway. *European Journal of Biochemistry* **252** (3): 360-372.

Hall, J. D., Mackenzie, N. E., Mansfield, J. M., McCloskey, D. E. & Scotts, A. I. (1988). 13C-NMR analysis of alanine metabolism by isolated perfused rat livers from C3HeB/FeJ mice infected with African Trypanosomes. *Comp. Biochemical Physiology* **89B**: 679-685.

Marx, A., de Graaf, A. A., Wiechert, W., Eggeling, L. & Sahm, H. (1996). Determination of the fluxes in the central metabolism of *Corynebacterium glutamicum* by nuclear magnetic resonance spectroscopy combined with metabolite balancing. *Biotechnology and Bioengineering* **49**, 111-129.

Schmidt, K., Carlsen, M., Nielsen, J. & Villadsen, J. (1997a). Modeling isotopomer distributions in biochemical networks using isotopomer mapping matrices. *Biotechnology and Bioengineering* **55**, 831-840.

Schmidt, K., Nielsen, J. & Villadsen, J. (1997b). Quantitative analysis of metabolic fluxes in *E. coli* using 2 dimensional NMR spectroscopy and complete isotopomer models. *Journal of Biotechnology*, in press.

Walker, T. E. and London, R. E. (1987). Biosynthetic preparation of L-[13C]-and [15N] glutamate by Brevibacterium flavum. *Applied and Environmental Microbiology* **53**: 92-98.

Walsh, K. & Koshland, D. E. (1984). Determination of flux through the branch point of two metabolic cycles-The tricarboxylic acid cycle and the glyoxylate shunt. *Journal of Biological Chemistry* **259**, 9646-9654.

Zupke, G. & Stephanopoulos, G. (1994). Modeling of isotope distributions and intracellular fluxes in metabolic networks using atom mapping matrices. *Biotechnology Progress* **10**, 489-498.

第 10 章　代谢通量分析的应用

前面两章叙述了胞内代谢通量的测定方法，以及它们在提供细胞代谢状态的全面情况方面的重要性。应该强调的是，代谢通量是细胞生理学的最基本的量度。与胞内代谢物浓度一起，为解释代谢通量控制的复杂机理（即代谢工程的中心要素）提供了必需的信息。就这点而论，代谢通量分析并不是简单地做一下矩阵变换的数学练习，而是要试图获得细胞状态最全面的状况，其与测得的胞内通量、同位素标记分布、GC-MS 以及其它特定的探查反应的数据相一致。更应注意的是，胞内通量估计作为实际体内代谢通量的可靠度量标准，而被接受的程度取决于带入计算中的冗余度。应谨慎对待仅从相等数量的代谢物平衡代数式计算所得的胞内通量，这是因为它们完全取决于假设的生物化学和胞外代谢物测量结果的精确性。另一方面，计算的代谢通量是相应的活体内胞内通量的更可靠量度，所计算的通量也与直接取决于通量的额外物理量的测量相一致。这些物理量包括：在胞内或胞外代谢物特定碳位上 ^{13}C 标记的富集度、代谢物 NMR 谱的细微结构、由于标记碳同位素而产生的代谢物分子量分布等。

本章将对两个代谢通量分析实例展开研究。这些实例的目的有三个方面。首先，它们可用来检验读者对所提出的概念和计算步骤的理解程度。为了有助于这种练习，在大多数情况下，给出了足够信息，以便可以独立确定通量，以及可与本章中报道的结果进行比较的其它参量。如果所需的数据量太大而不能包含在本书中，这种情况下，将为遗漏的信息提供足够的参考文献。这些例子的第二个目的是说明怎样通过代谢通量分析来提升实验信息的水平，以便更深入地了解细胞的代谢状态，然后提出进一步实验的有用建议。在许多情况下，从原始测量结果获取的额外信息与派生实验的结果一起，并不只是对原始发酵数据进行代谢通量分析所要求的勉强够格的工作的补偿。最后，所述方法论的步骤可以作为类似研究计划的蓝图，这类研究方案的目的，在于识别代谢网络中的关键分支点和最可能限制产物得率及生产能力的反应。

在文献中，人们可以发现代谢网络分析的很多其它实例研究，例如，对于下列一些系统。

● 用丝状真菌黄青霉（*Penicillium chrysogenum*）生产青霉素。该系统已被 Jorgensen 等人（1995）和 Henriken 等人（1996）分析过，他们应用代谢通量分析（MFA）来计算流加和连续培养期间的代谢通量分布。此外，他们用 MFA 计算了导向半胱氨酸的不同生物合成途径（半胱氨酸是青霉素生物合成的前体）的最大理论得率。在分析中，他们发现了经过戊糖磷酸途径的通量与青霉素生产之间的相关性。他们的模型是第一个考虑胞内分区的实例，即，该模型在胞质反应和线粒体反应之间进行了区分。

● 酿酒酵母（*Saccharomyces cerevisiae*）的厌氧生长。此系统已由 Nissen 等人（1997）分析过，他们分析的通量示意图之一示于图 8.1。除了计算代谢通量分布之外，他们还应用 MFA 来分析 *S. cerevisiae* 中各种同工酶的可能作用。在他们的分析中也考虑了胞内分区，并证实了这实际上可以解释乙醇脱氢酶的同工酶的作用。

● 酿酒酵母（*S. cerevisiae*）在葡萄糖/乙醇混合物上的生长。此系统已由 Van Gulik

和 Heijnen（1995）研究过，他们采用线性规划来估计在不同葡萄糖/乙醇混合物上生长时的通量，并证实了当乙醇分数增大时，糖异生通量升高。

● 大肠杆菌（*Escherichia coli*）的生长。Palsson 小组对此系统进行了广泛的研究，其中一些结果在例 8.8 中已讨论过。

所有这些案例研究将为学生的训练形成一个良好的基础，与此类似的更为详细的讨论将在下面两个所处理的案例中进行。

10.1 由谷氨酸细菌生产氨基酸

在商业上，最重要的天冬氨酸族氨基酸就是赖氨酸。在大多数动物饲料谷物，诸如玉米，大米，以及小麦中发现它数量有限。因此，这些谷物的营养价值可通过补充外部赖氨酸而得以显著提高。起初，赖氨酸是从蛋白质水解产物中分离的，而现在则是采用廉价碳源、利用微生物发酵大规模生产。已经分离出了大量可以分泌赖氨酸和谷氨酸的微生物。作为一类，把这些细菌称为谷氨酸细菌。虽然这类细菌似乎跨越几个不同的类，但已经发现这种分类是未经授权的，而且大多数谷氨酸菌可以分类在 *Corynebacterium sensu stricto* 属。研究已经表明，黄色短杆菌（*Brevibacterium flavum*）应当归类为谷氨酸棒杆菌（*Corynebacterium glutamicum*）。在本章，将使用后者名称来描述用于天冬氨酸族氨基酸生产的所有微生物。

本章的分析将集中在赖氨酸的过量生产上，并特别强调得率和生产能力问题。对于像赖氨酸这类的大体积、低附加值产品，这两个有价值的数值即使是轻微的提高，在经济上也是很关键的。根据报道，基于葡萄糖的工业摩尔得率在 30%～40% 的范围。由于理论得率估计高达 75%（见 10.1.2 节），因此，还有相当大的提高余地。为了判别各种因子在改善赖氨酸发酵特性中的重要性，提出了下列步骤作为系统工作的一部分。(a) 确定碳源（如葡萄糖）转化为赖氨酸的理论得率。(b) 进行标准的通量分析以及选择性的扰动发酵，以便对作为产物得率决定因子的不同代谢分支点的重要性按优先顺序进行排队。(c) 证实使用的标记化合物和突变株的特殊遗传背景，以区分两条可能的回补途径。(d) 严密分析恒化器及其它数据，评价合成反应和分解反应对限制性碳前体的竞争结果。(e) 说明通量分析在鉴别转氢酶活性中的应用，以及在平衡生物合成还原当量中的作用。

10.1.1 谷氨酸菌的生物化学与调节

表 10.1 给出了描述谷氨酸菌生物化学时所考虑的所有反应的综合清单。关于支持表 10.1 中所述生物化学的已测酶活性证据，可查阅 J.J.Vallino 的博士论文及其所列的参考文献。可以找出主要的葡萄糖加工、氨吸收及产物合成途径。这样，表 10.1 构建了一个基础框架，并具有各种变化（诸如 TCA 循环中乙醛酸支路的运行等），其中首先分析基本情况，各种变化将在后面研究。

表 10.1 谷氨酸棒杆菌（*Corynebacterium glutamicum*）代谢模型中包括的生化反应

谷氨酸棒杆菌的生物化学	代谢物积累速率向量	
PEP:葡萄糖转移酶系统	(1) AC	乙酸
(1) GLC + PEP = GLC6P + PYR	(2) ACCOA	乙酰辅酶 A
	(3) AKG	α-酮戊二酸
贮存化合物:海藻糖	(4) ALA	丙氨酸
(2) GLC6P + 0.5ATP = 0.5TREHAL + 0.5ADP	(5) ASP	天冬氨酸
	(6) ATP	腺苷-5′-三磷酸

续表

谷氨酸棒杆菌的生物化学	代谢物积累速率向量
EMP 途径	(7) BIOMAS　生物质
(3) GLC6P = FRU6P	(8) CO_2　二氧化碳
(4) FRU6P + ATP = 2GAP + ADP	(9) E4P　4-磷酸赤藓糖
(5) GAP + ADP + NAD = NADH + G3P + ATP	(10) FADH　还原型黄素腺嘌呤二核苷酸
(6) G3P = PEP + H_2O	
(7) PEP + ADP = ATP + PYR	(11) FRU6P　6-磷酸果糖
(8) PYR + NADH = LAC + NAD	(12) G3P　3-磷酸甘油酸
	(13) GAP　3-磷酸甘油醛
回补反应:PEP 羧化酶	(14) GLC　葡萄糖
(9) PEP + CO_2 = OAA	(15) GLC6P　6-磷酸葡萄糖
	(16) GLUM　谷氨酰胺
TCA 循环	(17) GLUT　谷氨酸
(10) PYR + COA + NAD = ACCOA + CO_2 + NADH	(18) ISOCIT　异柠檬酸
(11) ACCOA + OAA + H_2O = ISOCIT + COA	(19) LAC　乳酸
(12) ISOCIT + NADP = AKG + NADPH + CO_2	(20) LYSE　赖氨酸,胞外的
(13) AKG + COA + NAD = SUCCOA + CO_2 + NADH	(21) LYSI　赖氨酸,胞内的
(14) SUCCOA + ADP = SUC + COA + ATP	(22) MAL　苹果酸
(15) SUC + H_2O + FAD = MAL + FADH	(23) NADH　还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸
(16) MAL + NAD = OAA + NADH	(24) NADPH　还原型烟酰胺腺嘌呤二核酸磷酸
乙酸生成或消耗	
(17) ACCOA + ADP = AC + COA + ATP	(25) NH_3　氨
	(26) O_2　氧
谷氨酸、谷氨酰胺、丙氨酸及缬氨酸生成	(27) OAA　草酰乙酸
(18) NH_3 + AKG + NADPH = GLUT + H_2O + NADP	(28) PEP　磷酸烯醇丙酮酸
(19) GLUT + NH_3 + ATP = GLUM + ADP	(29) PYR　丙酮酸
(20) PYR + GLUT = ALA + AKG	(30) RIB5P　5-磷酸核糖
(21) 2PYR + NADPH + GLUT = VAL + CO_2 + H_2O + NADP + AKG	(31) RIBU5P　5-磷酸核酮糖
	(32) SED7P　7-磷酸景天庚酮糖
磷酸戊糖途径	(33) SUC　琥珀酸
(22) GLC6P + H_2O + 2NADP = RIBU5P + CO_2 + 2NADPH	(34) SUCCOA　琥珀酰辅酶 A
	(35) TREHAL　海藻糖
(23) RIBU5P = RIB5P	(36) VAL　缬氨酸
(24) RIBU5P = XYL5P	(37) XYL5P　5-磷酸木酮糖
(25) XYL5P + RIB5P = SED7P + GAP	
(26) SED7P + GAP = FRU6P + E4P	
(27) XYL5P + E4P = FRU6P + GAP	
氧化磷酸化:P/O = 2	
(28) 2NADH + O_2 + 4ADP = 2H_2O + 4ATP + 2NAD	
(29) 2FADH + O_2 + 2ADP = 2H_2O + 2ATP + 2FAD	
天冬氨酸族氨基酸	
(30) OAA + GLUT = ASP + AKG	
(31) ASP + PYR + 2NADPH + SUCCOA + GLUT + ATP = SUC + AKG + CO_2 + LYSI + 2NADP + COA + ADP	
(32) LYSI = LYSE	
生物质合成:$C_{1.97}$,$H_{6.46}$,$O_{1.94}$,$N_{0.345}$,3.02%灰分	
(33) 0.021GLC6P + 0.007FRU6P + 0.09RIB5P + 0.036E4P + 0.013GAP + 0.15G3P + 0.052PEP + 0.03PYR + 0.332ACCOA + 0.08ASP + 0.033LYSI	

谷氨酸棒杆菌的生物化学	代谢物积累速率向量
+ 0.446GLUT + 0.025GLUM + 0.054ALA + 0.04VAL + 0.052THR + 0.015MET + 0.043LEU + 3.82ATP + 0.476NADPH + 0.312NAD = BIOMAS + 3.82ADP + 0.364AKG + 0.476NADP + 0.312NADH + 0.143CO_2	
(34) ATP = ADP + P_i	

对于表 10.1 中所述的生物化学，有一些重要的地方应予以注意。

(a) 好几次，序列反应已通过消除中间代谢物而归并为一个单一反应步骤。例如，EMP 途径的反应 4 就是这种情况，反应 4 是由磷酸果糖激酶、1,6-二磷酸果糖醛缩酶、磷酸丙糖异构酶等反应归并的。这种归并减少了反应步数，而不会影响所得的通量结果。归并的反应假设按相同（稳态）速率进行，并且假设中间代谢物处于稳态。

(b) 将 PEP 羧化酶反应［反应 (9)］表示为一个代表性的总回补反应，而不是“单独”的回补反应。事实上，丙酮酸羧化酶、异柠檬酸裂解酶和苹果酸合成酶的组合、苹果酸酶、OAA 脱羧酶以及 PEP 羧激酶等反应与其它可能性一道，已被建议为这些细菌的回补途径。准确的反应尚在争论，本节部分篇幅将试图确认其性质。

(c) 由于天冬氨酸酶的活性很小或没有，且丙氨酸脱氢酶和亮氨酸脱氢酶尚未检测出，因此，铵吸收主要是通过谷氨酸脱氢酶和谷氨酰胺合成酶来实现的。此外，在发酵实验中使用的高铵离子浓度条件下，GS/GOGAT 铵同化途径被认为是不起作用的。在这些微生物中所检测的五个氨基转移酶中，仅天冬氨酸转氨酶就占总转氨酶活性的 90%以上。

(d) 赖氨酸合成途径的细节如图 9.4 所示。除了四步骤的内消旋二氨基庚二酸（*meso*-DAP）途径外，又证实了四氢吡啶二羧酸（H4D）直接转化为 *meso*-DAP 的另一途径。这两条途径似乎支持显著的碳通量。

(e) 表 10.1 中也列出归并的方程式，并与已确定的代谢物得率系数一起表示生物质合成。代谢物得率系数与测量的 *C. glutamicum* 的元素组成相匹配，元素组成为：C，47.6%；O，31.0%；N，11.8%；灰分，3.02%。

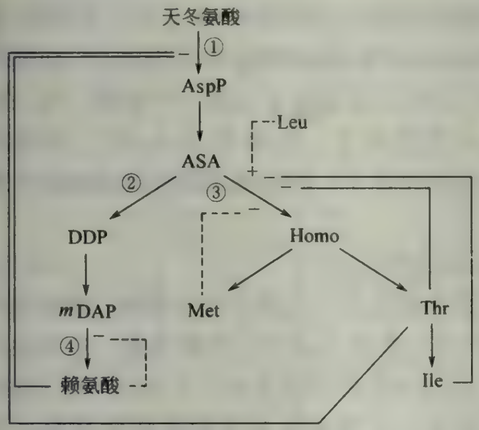
(f) 虽然在 *B. flavum* 的呼吸链中可能存在三个能量耦合位点，但在 *C. glutamicum* 中，似乎只有两个位点改变质子位置。因此，使 P/O 比等于 2。为了解释维持需要和无效循环，对于过量 ATP 的耗散反应 (34) 已经包括在内。然而，应注意的是，由于它们的不确定性，能量平衡并不用于通量确定。将它简单地包括在内，只是为了估计发酵过程中过量能量的可用性及可能的能量限制。

(g) 葡萄糖运输是通过磷酸转移酶系统，并伴随有 PEP 转化为丙酮酸。在不存在丙酮酸羧化活性时，这对理论得率特别是对苏氨酸的生产具有深远的影响。

(h) 在方程组中不包含转氢酶（THD）反应，这是由于起初并没有检测出其活性。这种省略会导致在某些突变株中以及 THD 的最终实验验证中违背关于 NADPH（通过一致性分析检测的）的稳态假设。

图 10.1 概括了赖氨酸生产途径的调控。在赖氨酸合成中，天冬氨酸激酶（AK）是一个关键酶，它受苏氨酸与赖氨酸的协同-多价-反馈抑制，但单独受其中一个氨基酸的抑制不明显。第 1 个赖氨酸生产菌株是高丝氨酸脱氢酶（HDH）活性缺乏的，即，不能合成苏氨酸（如 ATCC 21253 菌株）。它们因此可以积累高浓度的赖氨酸，而不存在反馈抑制，只要培

养基中补充有足够的高丝氨酸或苏氨酸加蛋氨酸，这些都是该菌种自己不能合成的。鉴于过量的苏氨酸会导致赖氨酸合成中断及细胞生长重新开始，因此，这种补充必须仔细保持平衡。最近的赖氨酸发酵过程大多是采用 AK 对反馈抑制不敏感的 *C. glutamicum* 菌株，其可以积累高浓度的赖氨酸。这样的菌株，例如 ATCC 21799 菌株等，由于其对不可代谢的赖氨酸类似物 *S*-(2-氨乙基)-L-半胱氨酸（AEC）的反馈抑制的抗性，被称为抗 AEC 菌株。另一个调控点是 ASA 分支点后的第 1 个酶，即高丝氨酸脱氢酶，其受苏氨酸强烈抑制和异亮氨酸的微弱抑制，也受蛋氨酸的阻遏。有文献报道，在 *B. flavum* 中，高丝氨酸脱氢酶是一个别构酶。在更为最近的突变株中，高丝氨酸脱氢酶活性已被减弱到这样一个水平，即可以内源性地供给足够的苏氨酸和蛋氨酸的下游氨基酸，但又低得足以防止它们积累到抑制水平。因此，在这种菌株中，含苏氨酸培养基的生物反应器进料控制已由等效的苏氨酸和蛋氨酸总供给的遗传调节所代替。由于这些氨基酸的供给限制这些菌株的生长，因此，后者已被称为 *bradytrophs*，即生长缓慢生物体。



缩写：AspP—天冬氨酰磷酸；
ASA—天冬氨酸半醛；
Leu—亮氨酸；
Homo—高丝氨酸；
Met—蛋氨酸；
Thr—苏氨酸；
Ile—异亮氨酸；
DDP—二氢吡啶二羧酸；
*m*DAP—消旋-*α*,*ε*-二氨基庚二酸

图 10.1 *Corynebacterium glutumicum* 中天冬氨酸族氨基酸的调控

调节酶是：①天冬氨酸激酶；②二氢吡啶二羧酸合成酶；③高丝氨酸脱氢酶；④二氨基庚二酸脱羧酶。实线表示抑制（－）或激活（＋），虚线表示阻遏（－）或诱导（＋）

10.1.2 理论得率的计算

理论得率可以根据底物转化为产物的总反应式来计算，或根据考虑辅助因子的更详尽的平衡式来计算，或根据生物反应网络的理论通量分析来计算。本节将对赖氨酸生物合成举例说明这些方法。首先要强调两点，第一，这三种方法应得到同样的结果，第二，最大理论得率不是特定产物-底物对的一个固有性质（正如一些出版物中经常暗示的）。相反地，它严格取决于促进总转化的特定代谢途径。

葡萄糖转化为赖氨酸可用下列总反应式来表示：

$$-aC_6H_{12}O_6-bO_2-cNH_3+C_6H_{14}N_2O_2+dCO_2+eH_2O=0 \tag{10.1}$$

反应式（10.1）中 5 个化学计量系数中的 4 个可根据碳、氮、氢及还原度的平衡来确定，得到：

$$-[(4+e)/6]C_6H_{12}O_6-(e-3)O_2-2NH_3+C_6H_{14}N_2O_2+(e-2)CO_2+eH_2O=0 \tag{10.2}$$

由此可得赖氨酸的摩尔得率被看做等于 $Y=6/(4+e)$。氧的化学计量系数根据基本原理是不可确定的。由于氧不会有净产生，因此，$e\geqslant3$。对于 $e=3$，得到赖氨酸的最大化学

计量得率 $Y=0.857$ (6/7) mol 赖氨酸/mol 葡萄糖。

当然，上述计算没有考虑任何辅助因子要求。换句话说，该方程式为赖氨酸的合成提供了足够的碳、氮、氢及氧。这个事实并不意味着可按要求的数量获得能量流通代谢物和还原当量，也不意味着满足所有中间代谢物的平衡。理论得率计算应考虑这些限制。

首先列出表 10.1 中主要代谢途径的总化学计量方程式。

糖酵解：
$$-GLC+PEP+Pyr+2NADH+ATP=0 \quad (10.3)$$

PEP 羧化酶：
$$-PEP-CO_2+OAA=0 \quad (10.4)$$

转氨酶：
$$-OAA-GLUT+ASP+AKG=0 \quad (10.5)$$

赖氨酸途径：
$$-ASP-Pyr-2NADPH-GLUT-2ATP+LYS+AKG+CO_2=0 \quad (10.6)$$

谷氨酸合成：
$$-NH_3-AKG-NADPH+GLUT=0 \quad (10.7)$$

将反应式 (10.3)～式 (10.7) 加和，得到下列更详细的赖氨酸生物合成方程式：

$$-GLC-4NADPH-2NH_3-ATP+LYS+2NADH=0 \quad (10.8)$$

由此可见，取决于转氢酶（THD）活性（使 NADH 可逆地转化为 NADPH）是否存在，合成 1mol 赖氨酸需要额外的 2mol 或 4mol NADPH。这反映了这样一个事实，即：赖氨酸比葡萄糖还原性更强（与葡萄糖的还原度 4 比较而言，还原度为 4.67）。所需的 NADPH 主要是由戊糖磷酸途径供给，在碳完全氧化的条件下，戊糖磷酸途径的总化学计量方程式如下。

PPP（完全氧化途径）：
$$-GLC6P+6CO_2+12NADPH=0 \quad (10.9)$$

在葡萄糖是由激酶运输并直接磷酸化这样一个简单情况下，上述方程式表明：需要额外的 1/6 或 1/3mol 葡萄糖来为赖氨酸合成反应[如(10.8)]提供 NADPH 还原当量，这又取决于 THD 活性是否存在。得到的赖氨酸摩尔得率为 6/7 (=0.857)或 6/8(=0.75)，这分别对应于总转化反应中 $e=3$ 或 $e=4$。然而，要考虑的另一个情况与葡萄糖磷酸转移酶系统（PTS）有关，每运输 1mol 葡萄糖进细胞，需将 1mol PEP 转化为丙酮酸：

$$-GLC-PEP+GLC6P+Pyr=0 \quad (10.10)$$

可将方程式 (10.3)、式 (10.9) 和式 (10.10) 都乘以 1/6，并与赖氨酸合成方程式 (10.8) 相加，假设 NADPH 和 NADH 由 THD 活性等价，则得：

$$-(8/6)GLC-2NH_3-(5/6)ATP+LYS+(1/3)Pyr+CO_2+(1/3)NADH=0 \quad (10.11)$$

只要不发生使丙酮酸转化为 OAA 的丙酮酸羧化反应，或者为了葡萄糖运输形成的丙酮酸循环而 PEP 合成酶活性不存在，则上述方程式表明理论得率为 6/8=0.75mol 赖氨酸/mol 葡萄糖。之所以这样，是由于除赖氨酸合成所需之外，任何额外产生的丙酮酸在 TCA 循环中被氧化，而且对产物得率不会有贡献。但在相反情况下，所合成的丙酮酸在回补途径中进一步羧化，从而增加赖氨酸的生产量，但也改变为此目的所需的 NADPH 量。这转而会改变为合成额外的 NADPH 以及其它物质而在 PPP 途径中必须氧化的葡萄糖量。可以容易地看出，虽然理论得率的这个直接计算方法在某些简单情况下是有吸引力的，但当代谢产物在所考虑的途径中被循环时，这会导致相当复杂的计算。

一个更一般的方法是使用代谢物平衡：根据方程式 (10.10)，每运输 1mol 葡萄糖进入细胞，要消耗 1mol PEP，并产生 1mol 丙酮酸和 1mol GLC6P。设 x 是 PP 途径中完全氧化的 GLC6P 的分数（PP 途径产生 $12x$ mol NADPH），则 $(1-x)$ 是糖酵解中被分解代谢的

分数，对于总共（$1-2x$）的 GLC6P，将产生 $2(1-x)$mol PEP。当存在 THD 活性，但没有丙酮酸羧化酶时，可根据下列有关 NADPH 的平衡确定分数 x。

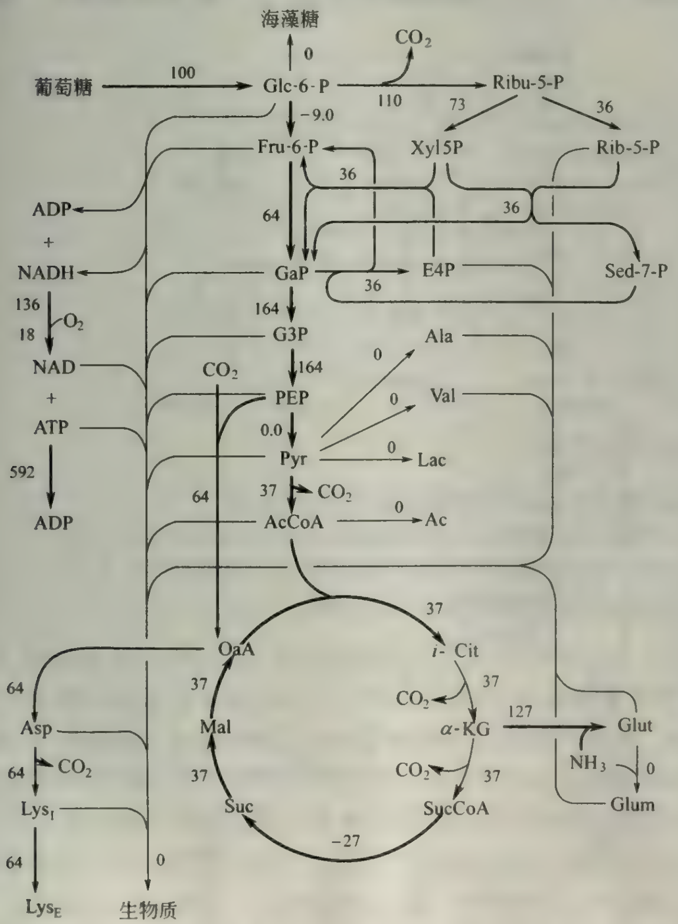
$$\text{产生的 NADPH}:12x=2(1-2x):\text{消耗的 NADPH} \tag{10.12}$$

由式（10.12）得出 $x=1/8$，从而计算出理论得率为 $1-2x=0.75$。当丙酮酸羧化酶反应作为另一回补途径包括在内时，或者 PEP 合成酶活性可以使通过 PTS 产生的过量丙酮酸循环时，则引入另一变量 y 来表示转化为 PEP 的丙酮酸量。该转化应产生等量的 PEP 和丙酮酸以确保碳完全利用［参看表 10.1，反应（31）］，这样结合 NADPH 平衡，得到下列确定 x 和 y 的方程式。

$$\text{形成的 PEP}:(1-2x+y)=(1-y):\text{形成的 Pyr} \tag{10.13}$$

$$\text{NADPH 平衡}:2(1-2x+y)=12x \tag{10.14}$$

求解方程式（10.13）和式（10.14），得出 $y=x=1/7$，赖氨酸理论得率为 0.857（6/7）。在只消耗必要的葡萄糖产生 NADPH 条件下，该理论得率可通过完全利用所有可利用的碳来获得。类似地，当 THD 不存在时，根据丙酮酸羧化酶活性是否补充 PEP 回补途径，理论得率分别为 0.75 和 0.60。应注意的是，在这个途径中，ATP 需求是最小的，且容易满足。



缩写：Glc-6-P—6-磷酸葡萄糖；
Ribu-5-P—5-磷酸核酮糖；
Fru-6-P—6-磷酸果糖；
Xyl5P—5-磷酸木酮糖；
Rib5P—5-磷酸核糖；
Gap—3-磷酸甘油醛；
E4P—4-磷酸赤藓糖；
Sed-7-P—7-磷酸景天庚酮糖；
G3P—3-磷酸甘油酸；
Ala—丙氨酸；
PEP—磷酸烯醇丙酮酸；
Val—缬氨酸；
Pyr—丙酮酸；
Lac—乳酸；
AcCoA—乙酰辅酶 A；
Ac—乙酸；
AsP—天冬氨酸；
Lys$_I$—赖氨酸（胞内）；
Lys$_E$—赖氨酸（胞外）；
OaA—草酰乙酸；
Mal—苹果酸；
Suc—琥珀酸；
i-Cit—异柠檬酸；
α-KG—α-酮戊二酸；
SucCoA—琥珀酰辅酶 A；
Glut—谷氨酸；
Glum—谷氨酰胺

图 10.2　赖氨酸摩尔得率为 64% 时的理论通量分布基于表 10.1 中模型所述的限制
限制是由于丙酮酸激酶的不可逆性造成的。由于 TCA 循环中产生额外的 NADPH，
所以 64% 得率超过文中的 60%，引自 Vallino（1991）

虽然前面的方法无疑是正确的，但正如有关 PTS 复杂性方面的例子完全证实的那样，它们易产生误差。误差的主要来源在于部分途径的总化学计量关系式的列出，以及中间代谢物和通用代谢物的所有来源和贮库的考虑。此处所述的步骤建议一个关于代谢物平衡的更加结构化的方法可以避免这些问题，并可得到一普遍适用的正规方法。代谢通量分析非常适合于此目的。在得率计算模式中，代谢通量分析（MFA）的目的不再是确定内部代谢通量，因为它们的大部分值已被设定以保证产品得率最大。这时 MFA 的目标是确定一些通量分配比，从而在产生最大产品的网络中所有的代谢物平衡能被满足。例如，在赖氨酸途径中，通过设定生物质生成速率为零，除赖氨酸之外的所有其它分泌的产物（乙酸、乳酸及海藻糖）的速率也为零，葡萄糖吸收速率为 - 100，赖氨酸合成速率等于得率 Y。对于给定值的 Y，总共有 34 个代谢物平衡，可以求解它们来确定表 10.1 的代谢网络的 34 个反应的通量。

第 8 章中的矩阵方程式可用来构建和方便地求解表 10.1 中赖氨酸代谢网络的 34 个方程式。对不断增大的赖氨酸得率求出理论通量，直到出现不可能的通量分布为止。对于没有 THD 和丙酮酸羧化酶活性的网络来说，当赖氨酸得率接近 60%，此时丙酮酸激酶（PK）通量达到零（见图 10.2），这种情况就会发生。零 PK 通量是前述 PTS 的直接结果。如果将 PEP合成酶或利用产生的丙酮酸的另一出口(像丙酮酸羧化酶)加入到反应网络中，则当

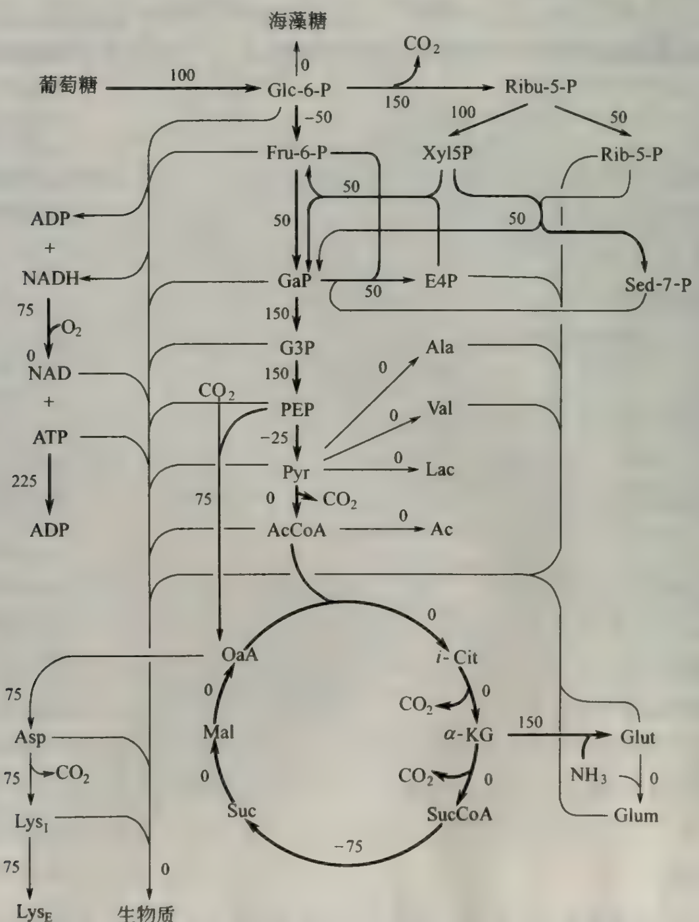


图 10.3 赖氨酸得率为 75%时的理论通量分布

得率极限是由于 TCA 循环通量的限制造成的。(丙酮酸激酶不可逆性的限制被放松）引自 Vallino (1991)

赖氨酸得率达到75%时，会出现下一个不可能性，此时受TCA循环支持的通量降为零（见图10.3）。进一步增大得率会导致TCA循环通量为负值。因此，在这些条件下，赖氨酸的最大理论得率为75%。如果再把转氢酶活性加到代谢网络中以使NADPH与NADH相互转化，那么类似的计算得出赖氨酸的最大理论得率分别为75%或85.7%，这取决于是否存在丙酮酸羧化酶，而且这与本节前述的辅助因子平衡方法的结果相一致。应注意的是，由于ATP的消耗反应（表10.1中的反应34）为非零，得率不受ATP可利用性限制。

图10.4（a）描述了在假设没有THD和丙酮酸羧化酶活性，赖氨酸得率等于35%的条件下，对前述网络所得的理论通量。在图10.4（b）中，提供了理论通量图，这时仍对35%的赖氨酸得率的情况，但针对一修改过的生物反应网络［在此网络中，PEP羧化酶的回补反应已由乙醛酸支路和OAADC取代，并同时移除了α-酮戊二酸脱氢酶（αKGDH)］。作此计算的意图是要人们注意这一点：对生物反应网络即使只作轻微的改变，通量分布也会有显著的差别。

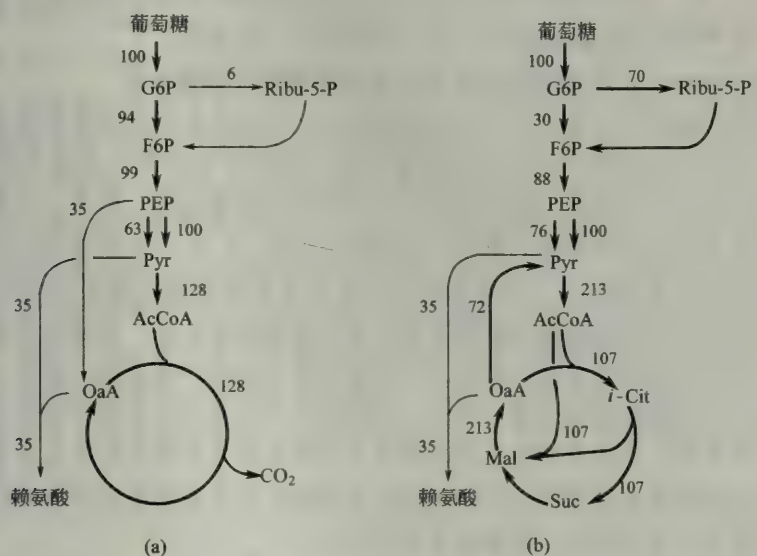


图10.4　支持赖氨酸得率为35%所必需的理论通量分布

基于（a）TCA循环或（b）乙醛酸支路的*C. glutamicum*网络中，PEP与丙酮酸之间的两个通量用于丙酮酸激酶（左）和葡萄糖PTS（右）的反应。引自vallino和Stephanopoulos1993（c）

缩写：G6P—6-磷酸葡萄糖；F6P—6-磷酸果糖

现补充下列四点作为本节的结束。

① 进行理论通量计算之后，可以计算CO_2释放速率及O_2吸收速率，从而确定呼吸商(RQ)的理论值。在最大理论得率为75%时，RQ等于2.0，该数值可用来按照其接近理论最大值的程度对发酵过程进行基准标定，也可用于生物反应器加料策略的设计以寻找最优操作点。

② 通过设定赖氨酸生产速率为零并改变生物质合成速率，人们可以重复前面的计算。这可得到生物质的最大得率为75%，这肯定过高，因为没有考虑维持需要和无效循环。

③ 如表10.2所示，去掉有关CO_2，NH_3及O_2的平衡式会急剧增加所得化学计量关系矩阵的条件数。但此值仍可接受，特别是考虑以下事实时，即：在这种情况下，测量向量的值不存在不确定性。一般地，那样大小的条件数可能是因为要考虑平衡式是否用实际的实验数据来求解。

表 10.2 当从网络中删除所选择的产生胞外代谢物的反应（括号中所示）时，赖氨酸代谢网络的条件数（见 8.4 节）

从网络中删除的代谢物		条件数	从网络中删除的代谢物			条件数
无		59	生物质	葡萄糖		155
生物质(7)		140	生物质	NH_3		174
CO_2(8)		59	生物质	O_2		207
葡萄糖(14)		61	生物质	赖氨酸		445
赖氨酸(20)		60	CO_2	O_2		762
NH_3(25)		61	生物质	赖氨酸	NH_3	462
O_2(26)		132	生物质	葡萄糖	NH_3	519
葡萄糖	O_2	136	生物质	葡萄糖	赖氨酸	726
NH_3	O_2	138	生物质	CO_2	O_2	845
生物质	CO_2	143	CO_2	NH_3	O_2	881
赖氨酸	O_2	144				

④ 最后一点是，在进行理论得率计算时，应有足够的方程数以便确定全部理论内部通量。只需注意对网络所加的额外限制，就可得到最大产物得率。

10.1.3 *C. glutamicum* 菌中赖氨酸生物合成网络的代谢通量分析

本节将证明代谢通量分析如何对代谢网络所选分支点的控制结构提供附加的洞察力。问题的焦点在于提高赖氨酸得率，正如前面讲到的，赖氨酸得率可在当前工业水平上显著提高。通常，为了提高产物得率，要增大产物途径中反应的酶活性。然而，产物得率最终是受关键分支点的通量分配比控制的。例如，在网络 A→B，B→C，以及 B→D 中，D 对 A 的得率严格取决于节点 B 的分配比。毫无疑问，产物途径中限制酶的增强可间接地影响节点分配比；但产物得率最终还是取决于这些节点对通量扰动的适应性。在刚性节点中，通量分配比对产物分支途径的活性不敏感，仅增强产物途径不会提高产物得率。此外，如果在正常条件下产物是以适当的速率进行合成，那么，通过减弱副产物分支途径来影响分配比可能更有利。代谢工程研究的一个焦点应该是把改变节点分配比作为提高产物得率的主要机制。在这方面，一个关键问题是识别那些对产物合成或导致副产物生成起决定性作用的分支点。这些分支点构成代谢网络的主节点，必须首先识别出来。

一旦识别出网络中的关键分支点，就必须进行特定扰动实验，以表征这些分支点的控制。在常规发酵过程中，代谢通量和代谢通量分配比会有变化，这些变化可以提供关于节点柔性或刚性的详细情况。然而，由于代谢物效应物浓度（其也在不同实验中改变）强烈地影响节点刚性，因此，对于由生物质和产物合成速率交换所诱导的全局变化所提供的信息必须谨慎解释。非常可能的是，这种全局扰动包括很多附加的影响，而这些影响在代谢平衡中不能精确地预料及说明。结果，为了阐明节点控制的具体特征，就需要更多的局部扰动。本章将通过探讨 6-磷酸葡萄糖和 PEP/丙酮酸复合分支点这两个具体节点的代谢控制来说明这一点。

应该注意的是，对于通量控制，本节的讨论采用了 5.4 节所介绍的节点柔性和刚性的概念。为了完全理解此处所给结果的解释，应复习一下那一节。此外，在 5.4 节中从定性方面介绍的刚性和柔性概念将在第 12 章中在代谢控制分析（MCA）范围内进一步扩展并进行定量描述。MCA 通常是描述线性或分支代谢途径中各个反应区段的柔性。同样的概念已在第 12 章中延伸，以表征代谢网络分支点的刚性。

根据本章的总目标，为了可以独立计算通量、通量分配比以及其它可通过应用代谢通量分析（MFA）得到的结果，要提供足够的信息。为了示范 MFA 的一般哲理，也提供了在

设计所介绍的实验中所用的策略及其理由的评述。生物网络（Bionet）可用来重现此处所给的结果。

主节点的识别

虽然代谢网络包含大量节点，但情况通常是，当产物得率改变时，只有几个节点的通量分配比实际上发生改变。这些节点由于直接影响产物得率而被称作主节点。其余节点的分配比相对不受影响，不值得进一步研究。为了找出主节点在网络中的位置，首先要识别出产物、副产物和底物。然后进行类似于前节所述的理论产物得率计算进行理论通量分析。主节点是通过产物得率的系统变化和不同节点的通量分配比的观察而被识别。

将此方法应用于赖氨酸生物合成网络，当赖氨酸得率升高时，五个分支点（即：Glc6P、Fru6P、PEP、丙酮酸和OAA）的分配比受到明显影响。其中只有两个分支点，即Glc6P和PEP/Pyr组由于下列原因而被认为是有兴趣的主节点。当赖氨酸得率小于60%时，Fru6P被证明是一个汇合点，而当赖氨酸得率高于60%时，Fru6P是一个分支点。在后一种情况中，异构酶反应逆转，而且Glc6P变成一个汇合点。因此，在Glc6P和Fru6P之间，其中一个总是分支点，而另一个是汇合点；而且由于一般得率总是低于60%，因此，在分析中仅把Glc6P考虑为一个主分支点。就OAA来说，对该节点的仔细研究表明，由于所有被柠檬酸合成酶消耗的OAA必须通过苹果酸脱氢酶（TCA循环中的最后一个酶）返回，所以它基本上是不重要的。本质上，TCA循环通量仅仅通过OAA节点，结果，用于赖氨酸合成所消耗的全部OAA是由回补途径产生的。这就强调了理解TCA循环及有关回补途径中质量平衡限制的重要性。应注意的是，所有经AcCoA进入TCA循环的碳必须被氧化为CO_2，而通过其它反应进入TCA循环的碳不能被氧化，而且最终必须离开循环以便为生物质及产物合成提供前体。鉴于对这些概念的误解，已建议通过直接接入富马酸库，天冬氨酸酶会提高天冬氨酸的利用率。然而，富马酸并不比草酰乙酸可利用性高，因为它们任何一个的净产量都受回补途径通量的支配。这一点已被引入天冬氨酸酶活性试图提高赖氨酸得率而失败的事实所证实。

上述主节点，Glc6P和PEP/Pyr组，简单地反映了这样一个事实：赖氨酸合成所需的四个前体（碳、NADPH、ATP及氨）中，两个（碳和NADPH）依赖于葡萄糖供给，并因此依赖于上述分支点的代谢通量分布。其余两个前体（ATP及氨）显然不存在任何限制。这是由于（a）伴随产生碳前体的葡萄糖分解代谢的反应可产生足够的ATP，以及（b）为了氨基酸和赖氨酸生物合成的氮吸收反应是通过谷氨酰胺合成酶和谷氨酸脱氢酶同化系统充足提供的。如果后者不是这样，那么，提供ATP和补充谷氨酸用于氨同化途径的反应也应包含在赖氨酸生物合成网络的主分支点清单中。

总结一下赖氨酸得率对两个主节点分配比的依赖性，注意到当赖氨酸得率提高时，必须有较高比例的葡萄糖转入戊糖磷酸途径（PPP）以满足不断增长的NADPH需求。如果该节点的实际酶动力学是糖酵解途径对Glc6P的争夺超过PPP（戊糖磷酸途径）这种情况，那么，赖氨酸将是NADPH限制的，而且进入糖酵解的过量碳最终会导致副产物产生。然而，如果Glc6P节点分配比是柔性的而容易改变，以致准确满足NADPH需求，则赖氨酸得率限制由PEP/Pyr主节点的次优分配所引起。如果PEP/Pyr支路的回补途径分配比小于50%，则不充足的OAA将被合成，且产生过量的丙酮酸，其很可能在TCA循环中被氧化。如果回补支路分配比大于50%，则将合成过量的OAA，其可能导致天冬氨酸或谷氨酸分泌（虽然这一点尚未观察到）。在Glc6P和PEP/Pyr节点，最优的分配将导致最优的赖氨酸合

成和理论产物得率。这是否可行取决于影响上述分支点分配比的酶反应的动力学和调控。通过引入如下所述的特定的局部扰动，可以确定它们对赖氨酸生产的限制程度。

Glc6P 分支点的通量扰动分析

为了研究 Glc6P 分支点的柔性，进行了两个特定的扰动实验。第一个扰动是减弱 Glc6P 异构酶（GPI），即糖酵解的第一个酶，然后进行发酵，并对所得的 ATCC 21253 菌株 *C. glutamicum* 的突变株 NFG068 进行通量分析。将该突变株分离出来，以试图使代谢通量改向进入戊糖磷酸途径。第二个扰动是在 *C. glutamicum* ATCC 21253 菌的发酵过程中使用葡糖酸盐作为惟一碳能源。通过提供直接进入戊糖磷酸途径的碳源，葡糖酸盐有效地绕过了 Glc6P 分支点，并提供了有关 Glc6P 对赖酸合成施加控制的额外信息。

关于发酵规程和所获结果的详细情况，应当参考 Vallino 和 Stephanopoulos（1994a）的原始文献。如果与 ATCC 21253 菌的控制发酵相比较，GPI 突变株则表现出在生长期间所有胞外代谢物的比生产速率和比消耗速率都减弱了。其以低的比生长速率生长而以原始菌株 50%的速率呼吸。所得的最终生物质浓度也比较低。赖氨酸最终效价大于控制发酵 25%。与 30%的标准摩尔得率相比，赖氨酸合成起始时的瞬时得率是 34%。上述变化可按偏离标准发酵来进行解释。然而，这将会导致错误的结论，因为根据对由此发酵数据构建的代谢通量图的仔细检查可以看出，它与基准发酵的差异是最小的。此外，产物得率的升高并不持续，终产物效价较高是较长期的运转而不是一个延续的高得率。

表 10.3 给出了测量的和估计的代谢物积累速率，以及反映质量平衡约束的闭合（closure）程度的一致性指数。与控制发酵相比较，NFG068 发酵的代谢物积累速率要小将近 2～3 倍，主要是生物质生长减小的结果。图 10.5 的通量分布图与在同样条件下控制发酵期间所观测到的非常类似。因此，即使突变使总生长和生产动力学发生显著改变，NFG068 突变株中的 GPI 活动减弱 90%也不会导致 Glc6P 分支点的通量分配发生任何显著改变。突变不会显著改变赖氨酸的瞬时得率，但在生长期间和生产初期降低了通过网络的比通量。这些结果与拥有刚性分支点的依赖性网络概念是一致的（参看下面内容及 5.4 节）。

表 10.3　34.3h 时，NFG068 发酵的代谢物积累速率的测量值、估计值以及标准偏差

代谢物	积累速率/$mmol \cdot (L \cdot h)^{-1}$		代谢物	积累速率/$mmol \cdot (L \cdot h)^{-1}$	
	测量值	估计值①		测量值	估计值①
乙酸	0±1	0.02	赖氨酸	3.16±0.2	3.16
丙氨酸	0±1	0	NH_3	−5.5±5.8	−6.3
生物质	−0.17±0.9	−0.15	O_2	−22.7±2.3	−23.0
CO_2	26.5±2.7	26.2	丙酮酸	0±1	0
葡萄糖	−9.0±2.5	−8.7	海藻糖	0.46±1	0.57
乳酸	0±1	0.03	缬氨酸	0±1	0.08

注：数据取于 31h 和 37.5h 的测量结果。一致性指数 $h=0.09$，数据取自 Vallino 和 Stephanopoulos（1994a）

① 所估计的速率是那些严格满足质量平衡限制，而且是从估计的通量推导出来的。

要把 Glc6P 分支点归为柔性的，或弱刚性的，或强刚性的（见 5.4 节），对上述每种情况将实际结果与期望的扰动结果进行比较是有启发的。如果由于 GPI 对 Glc6P 的亲和力比 Glc6P 脱氢酶高（PPP 中的第 1 个酶），而使碳通量优先进入糖酵解途径，则 Glc6P 分支点是弱刚性的。如果赖氨酸得率受弱刚性 Glc6P 分支点的限制，那么 GPI 扰动应当已经提高了得率，因为 GPI 减弱应当增加 Glc6P 并允许更多 Glc6P 进入 PPP 途径。但这一点并没有观察到。为了研究Glc6P是强刚性的可能性(即：由于分支点中两个酶的有力调控，通量分

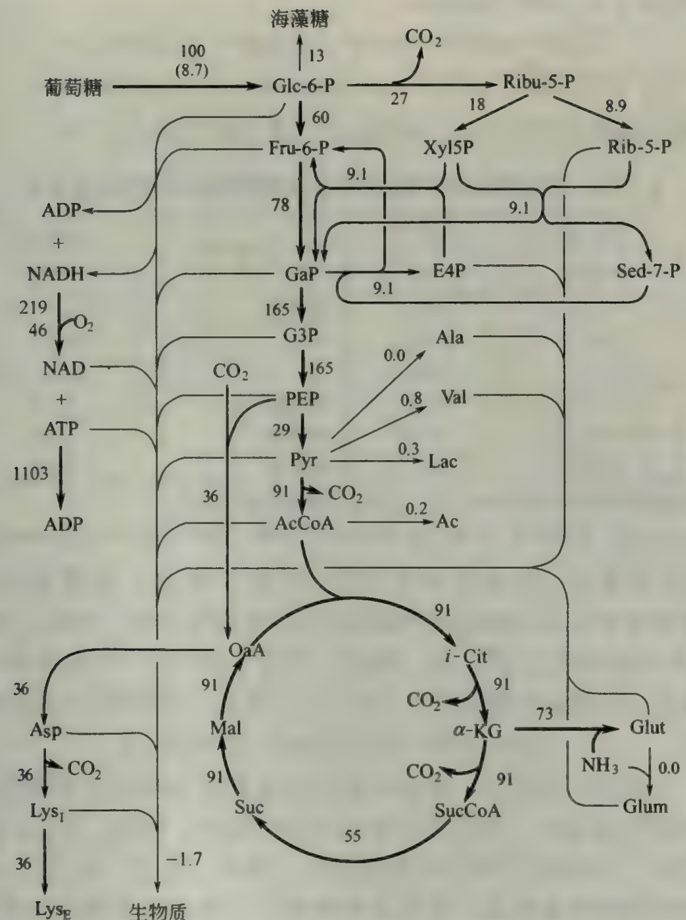


图 10.5　34.3h 时，NFG068 赖氨酸发酵的通量分布

通量是根据取于 31h 和 37.5h 的测量结果估计的，并经葡萄糖吸收速率［示于括号中，$mmol\cdot(L\cdot h)^{-1}$］归一化处理。改自 Vallino 和 Stephanopoulos（1994a）

配比是不服从变化的），第二个扰动实验是通过使用葡糖酸盐作为碳源来进行的。葡糖酸盐基本上绕过 Glc6P 分支点而直接进入戊糖磷酸途径。结果，如果 Glc6P 分支点是强刚性的，并限制了赖氨酸的得率，那么，在葡糖酸盐上培养 *C. glutamicum* ATCC 21253 应当提高赖氨酸得率。在没有任何提高的情况下，应意味着 Glc6P 确实是柔性分支点，而且其能通过适应其通量分配比而响应于代谢网络变化着的要求。表 10.4 给出了当以葡糖酸盐作为碳-能源时代谢物积累速率的测量值和估计值。应注意的是，单独在葡糖酸盐上时，*C. glutcunicum* ATCC 21253 生长并不好；然而一旦加入葡萄糖，其生长速率又恢复正常（约 $0.3h^{-1}$）。赖氨酸合成开始后，一旦培养基中的葡萄糖被耗尽，葡糖酸盐作为惟一碳源时，就得到表 10.4 中的数据。结果表明，瞬时摩尔得率不超过 34%。其它显著的发酵特征包括：呼吸商高于正常水平（1.35），通常观测到的发酵副产物完全没有。缺少副产物合成使一致性指数非常令人满意。图 10.6 表示从这些数据所得的通量图。对表 10.1 中的代谢网络作了下列改进，以表示葡糖酸盐的附属的化学过程。用下式表示葡糖激酶反应：

$$-\mathrm{Glcn}-\mathrm{ATP}+\mathrm{Glcn6P}+\mathrm{ADP}=0 \qquad (10.15)$$

式中，Glcn 表示葡萄糖激酶；Glcn6P 表示 6-磷酸葡糖酸。

而且 PPP 的氧化性分支分为两个反应：

$$-Glc6P - H_2O - NADP + Glcn6P + NADPH = 0 \tag{10.16}$$

$$-Glcn6P - NADP + Ribu5P + CO_2 + NADPH = 0 \tag{10.17}$$

此处 6-磷酸葡糖酸内酯酶反应已经与 G6PDH 归并在反应（10.16）中。

表 10.4　用葡糖酸盐作碳源时赖氨酸发酵中的代谢物积累速率

代谢物	积累速率/mmol·(L·h)$^{-1}$		代谢物	积累速率/mmol·(L·h)$^{-1}$	
	测量值	估计值①		测量值	估计值①
乙酸	0±2	0	赖氨酸	5.48±0.4	5.48
丙氨酸	0±2	0.02	NH_3	−12.8±1.1	−12.3
生物质	1.67±3.2	1.72	O_2	−48.0±4.8	−48.0
CO_2	62.4±6.2	62.4	丙酮酸	0±2	0
葡萄糖	−17.0±3.9	−17.0	海藻糖	0±2	0.02
乳酸	0±2	0	缬氨酸	0±2	0.03

① 所估计的速率是那些严格满足质量平衡约束，并从估计通量推导出来的。

注：一致性指数 $h=0.003$。数据是进入发酵［8h 和 21h 时采集的。引自 Vallino 和 Stephanopoulos（1994a)］。

当根据表 10.4 的速率计算通量分布图时，反应（10.16）表现为负通量。这是由于 NADPH 的合成速率显著高于生物质和赖氨酸合成所需而造成的。然而，由于非常大、正的标准自由能，使该反应本质上不可逆，因此，反应（10.16）不能逆向进行。为了允许 NADPH 达到拟稳态，从网络中删除反应（10.16），并用一直接的 NADPH 氧化反应代替：

$$-2NADPH - O_2 + 2H_2O + 2NADP = 0 \tag{10.18}$$

应注意的是，上述反应只是用一简单的氧化反应表示 NADPH 的消耗。另一方法可以是转氢酶反应。在这个反应中，NADPH 被氧化为 NADP，同时，NAD 还原为 $NADH^+$。在进行前面的研究时，并未证实存在转氢酶活性，因此，反应（10.18）的加入可以满足 NADPH 拟稳态和代谢物质量平衡。进行这些修改后，所得的通量分布图如图 10.6 所示。除戊糖磷酸途径（PPP）之外，通量分布图与控制发酵的相当相似。使用葡糖酸盐所产生的过量 NADPH 没有增加赖氨酸得率。正如以前建议的，这强烈地暗示赖氨酸得率不受 NADPH 的可利用性所限制，而且 Glc6P 也不是刚性分支点。结合 GPI 通量分析的结果，可以得出以下结论：Glc6P 分支点确实是一个柔性分支点，容易满足对产物和生物质合成的 NADPH 需求变化而产生响应。

虽然本节的讨论主要集中于延长期内恒定生理状态的通量图特征的推导，但应指出的是，只要不违背有关胞内代谢物的稳态假设，而且可以在线测量胞外代谢物的积累速率，那么，也可获得瞬态期间的胞内通量图。在这些条件下，可以进行在线代谢通量分析，而且通常可以得到具有重要价值和意义的结果。

已对 *C. glutamicum* 的分批赖氨酸发酵进行了这样的在线代谢通量分析（Takiguchi 等人，1997)，图 10.7 描绘了通过戊糖磷酸途径的计算通量（r_7）与赖氨酸通量（r_8）之间的关系。应注意以下三点。

- 第一，可以看出有两个不同的生理状态，其中一个是细胞生长（状态 1)，另一个是赖氨酸合成（状态 2)；以及从状态 1 到状态 2 过渡期间所得到的瞬态点。

- 第二，状态 2 中的直线斜率等于 1/2，反映了赖氨酸合成时对 NADPH 的化学计量需要。参照式（10.8)，可以看出，假设转氢酶活性存在时，即：实质上以 NADH 和 NADPH 的形式使还原当量相等，合成每摩尔赖氨酸需2mol NADPH。当不存在THD活性时，图

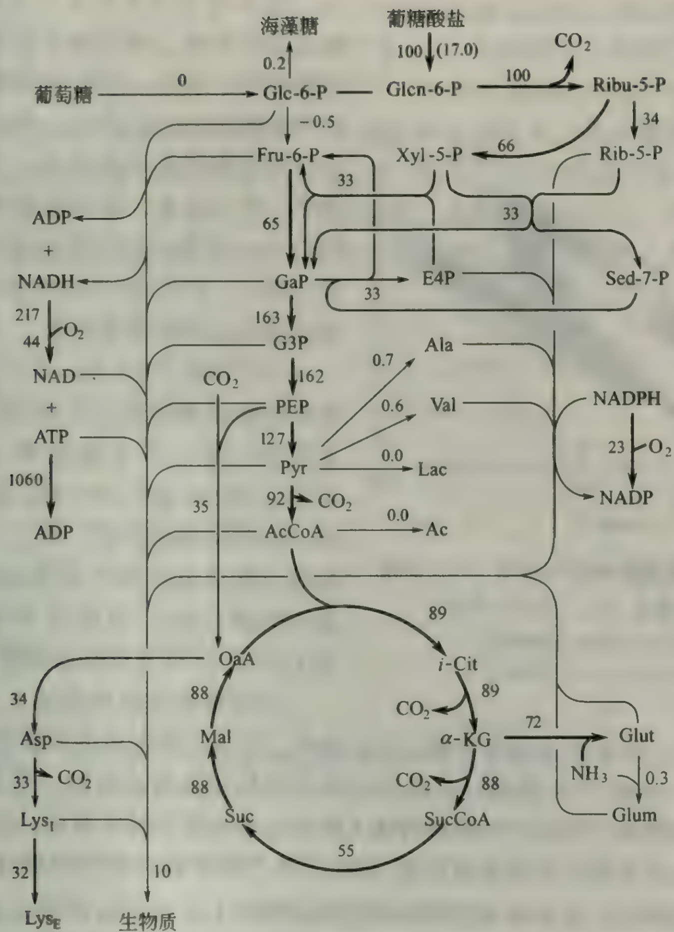


图 10.6 葡糖酸盐发酵 19h 时的代谢通量分布

通量是根据取于 18h 和 21h 时的测量结果估计的，并经葡糖酸盐吸收速率［示于括号中，mmol·（L·h）$^{-1}$］归一化处理。注意：根据文中的讨论，PPP 的第 1 个酶已被去掉，并增加了葡糖酸激酶反应和 NADPH 的直接氧化反应，从而消除了不一致性。改自 Vallino 和 Stephanopoulos（1994a）

10.7 中表示状态 2 的直线斜率应等于 1/4 以反映赖氨酸合成新的化学计量关系。

● 第三，通过戊糖磷酸途径的通量与赖氨酸生产之间的线性相关性表明：戊糖磷酸途径通量具有为满足赖氨酸的生物合成需求而进行自我调节的能力。这是本节讨论的 Glc6P 分支点的柔性的补充的证实。应注意的是，这些信息中没有一件能从酶活性的分析中得到。在进行图 10.7 的实验时，酶活性保持相当平稳。

在 PEP/Pyr 分支点的通量扰动分析

由于 PEP 羧化酶反应和 Pyr 羧化酶反应这两个回补反应对赖氨酸合成的贡献尚未描述，为简单起见，将 PEP 和 Pyr 组合在一起。缺乏这样的信息时，要区别这两个羧化反应是不可能的，因此，将这两个羧化反应组合为一个。丙酮酸代表一个重要的分支点，这是因为，除了回补反应外，在赖氨酸合成途径中，它也在二氢吡啶二羧酸合成酶反应中与天冬氨酸半醛进行缩合。此外，它可在丙酮酸脱氢酶复合体（PDC）反应中形成乙酰辅酶 A，并在 TCA 循环中进一步被氧化。如果 PEP/Pyr 分支点是弱刚性的，则由于 PDC 酶对丙酮酸的亲和性比 PEP 和 Pyr 羧化酶的要高得多，因此，碳通量优先进入 TCA 循环。在这种情况

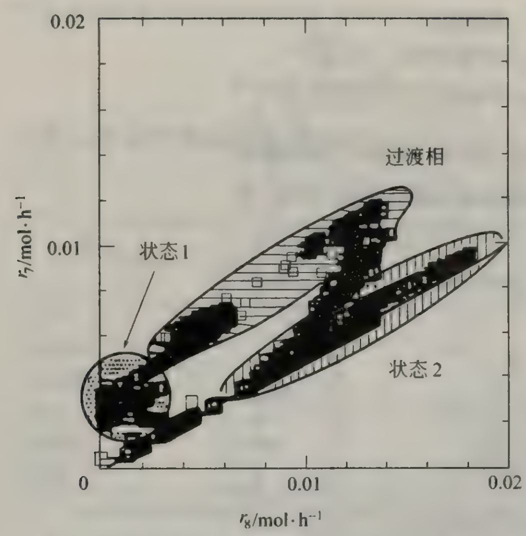


图 10.7 通过戊糖磷酸途径的通量（r_7）和流向赖氨酸的通量（r_8）的相平面图
数据取自分批发酵的不同阶段。
改自 Takiguchi et al（1997）

下，TCA 循环通量相对不受赖氨酸途径中通量变化的影响，而产物得率受丙酮酸可利用性的限制。因此，如果赖氨酸得率受到弱刚性丙酮酸分支点的损害，那么，PDC 的减弱应增大丙酮酸的可利用性，从而提高赖氨酸得率。另一方面，如果赖氨酸得率低是由于 PEP/Pyr 分支点的强刚性或者回补活性非常低，那么，PDC 减弱应导致某些中间代谢物的分泌或总网络通量降低。

为了检验 PEP/Pyr 分支点的刚性通量分配限制赖氨酸得率的可能性，进行了两个扰动实验。第一个实验包含 *C. glutamicum* ATCC 21253 的一株 PDC 减弱突变体的分离、发酵及通量分析。第二个实验涉及在赖氨酸过量合成开始之后通过加入特异抑制剂氟丙酮酸（FP）而抑制 PDC 活性，然后监测 PEP/Pyr 分支点的通量变化。

在常规葡萄糖培养基上，PDC-减弱突变株表现出生长困难，因此在培养基中加入了乙酸钾。加入乙酸盐的生长促进作用与该菌株的 PDC 减弱相一致。由于（a）通量计算是在乙酸盐消耗完之后进行的，以及（b）葡萄糖存在时乙醛酸支路被抑制，因此，乙酸盐的加入并不会使通量分析复杂化。与控制发酵相比较而言，生长速率及所有胞外代谢物的积累-消耗速率严重减弱，但它们随时间的变化图与控制发酵中观察到的相似。比速率大约降低到控制发酵的 1/2～1/3。然而，在赖氨酸生产期，得到的通量分布图［Vallino and Stephanopoulos，(1994b)］与控制发酵的非常相似。此外，PEP/Pyr 分支点的通量分配比也与控制发酵类似。因此，PDC 活性减弱 98％没有改变主分支点的通量分布，也没有导致赖氨酸得率提高，虽然其确实使总网络的通量显著减弱。

如果赖氨酸得率仅受弱刚性 PEP/Pyr 分支点限制（即，如果碳优先进入 TCA 循环，以致赖氨酸合成实质上是丙酮酸限制的），那么，PDC 减弱应当提高丙酮酸的利用率和赖氨酸得率。由于这一点并未观察到，因此，可以得出以下结论：赖氨酸得率不是由弱刚性 PEP/Pyr 分支点所限制。

如前所述，赖氨酸生物合成发生在一个依赖型网络中。在这种网络中，必须协调分配所有主分支点上的通量，以获得高得率。如果一个依赖型网络中有一个或多个主分支点是刚性的或者包含活性非常低的反应，那么，通量分配就不能协调一致改变来满足产物的化学计量要求。此外，如果代谢控制阻碍中间代谢物的分泌或积累，那么一个依赖型网络的某一刚性节点的任何支路的减弱将导致总通量降低。因此，从 PDC 的减弱中观察到的结果与依赖型网络是一致的，该网络拥有刚性分支点或由一个支路的活性所限制。由于 Glc6P 分支点是柔性的，因此，该网络的刚性一定是由于 PEP/Pyr 分支点的反应之一的刚性或限制所带来的。这个结论已通过使用氟丙酮酸（FP)(PDC 活性的抑制剂）进行的抑制实验得到了进一步的证实。紧接着 FP 的加入，呼吸急剧下降，并伴随着比生长速率减小以及胞外丙酮酸的积累。但赖氨酸合成速率和葡萄糖消耗速率未受影响。加入 FP 几个小时后，呼吸重新开

始，分泌的丙酮酸被重新消耗，而且可能是由于丙酮酸的重新消耗，葡萄糖吸收表现为暂时下降。扰动的暂时特性无疑是由于 FP 的破坏作用，FP 在短时间后可被代谢掉。余下来的发酵表现出类似于控制发酵的特征。在这种情况下，计算出通量，得到的通量图描述了丙酮酸从 TCA 循环到丙酮酸分泌的转向情况。与控制发酵比较而言，其余途径中的通量分布相对不受影响。这些结果在图 10.8 中进行了描述，其分别表示控制发酵和扰动发酵围绕 PEP/Pyr 分支点的通量分布。相对于 PEP 合成速率，通量已经归一化。FP 对 PDC 的抑制作用可使受 PDC 支持的通量降低约 50%，但分支点的通量分布仍相对未受影响。

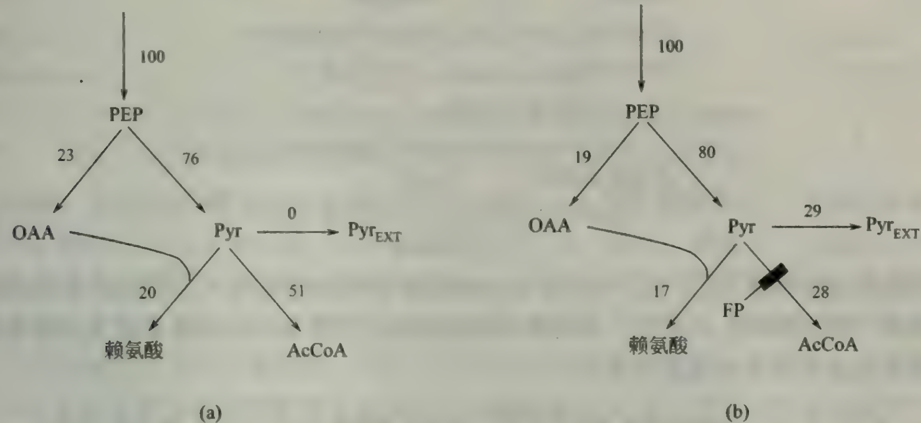


图 10.8 PEP 和 Pyr 主分支点周围已用 PEP 合成速率归一化的通量分布

(a) 为 13.5h 时的控制发酵，(b) 为 13.5h 时的氟丙酮酸（FP）扰动发酵

实心矩形表示 FP 抑制的位置、Pyr_{Ext}表示胞外丙酮酸。不是所有涉及 PEP、草酰乙酸，或丙酮酸的通量都被标出。引自 Vallino and Stephanopoulos（1994b）

氟丙酮酸抑制实验可视为在 PDC-减弱突变株中所展现出的对 TCA 通量的更长期破坏的瞬态模拟。在 PDC-减弱突变株中，葡萄糖吸收、糖酵解和 TCA 这些通量降低到野生型的 1/3～1/2，而且观察不到中间代谢物的积累或分泌。在氟丙酮酸抑制条件下，正常情况下较高的 PDC 通量急剧降低，并促使丙酮酸作为糖酵解通量的一个出口而分泌出来，糖酵解通量在加入氟丙酮酸之后仍保持较高水平。偏爱回补途径的通量分配的变化在两个扰动实验中都没有观察到。结果，尽管在羧化反应以及与二氢吡啶二羧酸合成酶反应中的天冬氨酸半醛（ASA）缩合反应中，丙酮酸的可利用性相当高，但赖氨酸得率仍未受影响。可以得出结论：赖氨酸得率不受在 TCA 循环中丙酮酸优先消耗所限制，因此，PEP/Pyr 分支点不是弱刚性的。赖氨酸生产因而或受强刚性 PEP/Pyr 分支点限制，或受回补反应的低活性的限制。要提高赖氨酸得率，应集中解除 PEP/Pyr 分支点一些反应（PDC、Pyr 羧化酶、PEP 羧化酶）的调节，或试图提高回补反应的通量，最可能的是催化丙酮酸羧化的反应。

10.1.4 *C. glutamicum* 特定缺失突变株的代谢通量分析

在前面几节中发现了两个在生理学和生物技术方面具有重要意义的问题，即：由超活性戊糖磷酸途径产生的过量还原当量的消耗方式的阐明，以及为生物质和产物合成提供碳的精确回补路线的确定。由于这些问题不能用通常的野生型菌株来解决，因此，寻找了具有简化了的遗传背景的突变株以易于研究。特别地，PEP 羧化酶（PPC）和丙酮酸激酶（PK）被作为目标，这是由于这两个酶在经 TCA 循环产生能量的碳代谢物的供应途径中，或者在为通过 OAA 前体合成而进行的生物合成的碳代谢物的供应途径中都起着关键作用。这两个酶

组合的破坏突变株（disruption mutants）是通过转移接合（transconjugation）构建的，在标准分批发酵中培养，而且在代谢通量分析的框架内对结果进行了评价（Park et al, 1997a）。表 10.1 的生物反应网络增加了下列 5 个反应以考虑附加的可能性：丙酮酸羧化反应（10.19）、转氢酶活性（10.20）以及另外三个胞外代谢物｛蛋白质［PROP，（10.21）］、甘油醛［GLY，（10.22）］及二羟丙酮［DHA，（10.23）］｝。在上述突变株的发酵培养基中发现 PROP、GLY、DHA 这三个胞外代谢物发生积累。

$$-\underset{(\text{丙酮酸})}{Pyr} - CO_2 - ATP + \underset{(\text{草酰乙酸})}{OAA} + ADP = 0 \tag{10.19}$$

$$-NADPH - NAD + NADP + NADH = 0 \tag{10.20}$$

$$-\underset{(\text{琥珀酸})}{Suc} + \underset{(\text{丙酸})}{PROP} + CO_2 = 0 \tag{10.21}$$

$$-\underset{(\text{3-磷酸甘油酸})}{G3P} - ADP + \underset{(\text{甘油醛})}{GLY} + ATP = 0 \tag{10.22}$$

$$-G3P - ADP + \underset{(\text{二羟丙酮})}{DHA} + ATP = 0 \tag{10.23}$$

实验结果总结在表 10.5 中，并给出了 4 种菌株在单纯生长期（Ⅰ）和没有生长且高赖氨酸合成期（Ⅱ）的比生长速率、葡萄糖比消耗速率、赖氨酸比合成速率以及在葡萄糖培养基上的细胞质量得率和赖氨酸得率。

表 10.5　*C. glutamicum* ATCC 21253[1]与缺失突变株 Δ*ppc*、Δ*pyk* 及 Δ*ppc*Δ*pyk* 在两个不同时期的发酵结果比较[2]

参数	Ⅰ期				Ⅱ期			
	wt	Δ*ppc*	Δ*pyk*	Δ*ppc*Δ*pyk*	wt	Δ*ppc*	Δ*pyk*	Δ*ppc*Δ*pyk*
μ	0.35	0.26	0.27	0.12				
Y_{sx}	0.54	0.59	0.50	0.36				
r_s	0.59	0.59	0.53	0.33	0.35	0.29	0.25	0.11
r_p	0	0	0	0	0.08	0.11	0.04	0.02
Y_{sp}	0	0	0	0	0.25	0.27	0.17	0.21

① wt 表示野生型菌株。

② 比生长速率，比速率及得率分别以 h^{-1}、$g\cdot g^{-1}(DW)\cdot h^{-1}$及 $g\cdot g^{-1}$（消耗的葡萄糖）表示。

C. glutamicum 中丙酮酸羧化对 PPC 的补偿

表 10.5 的结果应根据图 10.9 来评价，图 10.9 总结了导致 OAA 生成的可能的回补路线。*ppc* 基因的破坏使生长及赖氨酸生产本质上未受影响这一事实表明：在 *C. glutamicum* 菌中存在一条（一些）额外的回补途径。可能地，有两条替代途径用于 OAA 的合成：（1）一条是通过除了 PPC 外的一些酶（诸如 PEP 羧激酶、PEP 羧基转磷酸酶，或转羧化酶）作用的 PEP 羧化；（2）另一条是经丙酮酸的羧化。

用 *pyk* 和 *ppc pyk* 突变株所得结果并不支持一条替代 PEP 羧化途径的存在。如果这样一条途径真的存在，那么，在 *pyk* 突变株中，PEP 转化为丙酮酸的阻断应导致 PEP 积累并增加 OAA 合成（因而也增加赖氨酸合成）（注意：葡萄糖 PTS 运输的丙酮酸足够用于与天冬氨酸半醛缩合）。相反的是，赖氨酸的生产能力和得率分别减小了约 50% 和 30%，这与丙酮酸羧化是主回补途径这一观点相符合：因为在 *pyk* 突变株中丙酮酸可用性降低，回补通量和赖氨酸生产能力也下降。

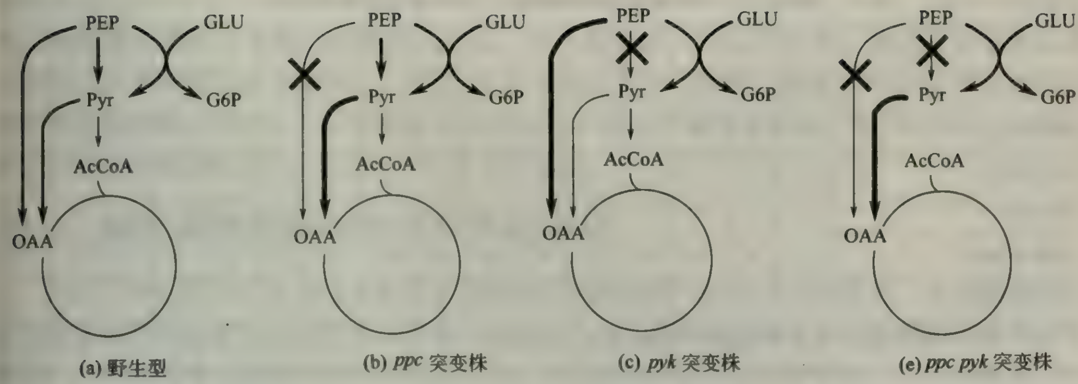


图 10.9　不同突变株中围绕 PEP 和丙酮酸节点的通量图

带箭头曲线的粗细表示通量的大小。引自 Park et al（1997a）

同样地，如果 PEP 羧化是主要回补途径，则在 *ppc* 突变株情况下，应当观察到赖氨酸生产下降。然而，这并未得到表 10.5 中的数据的支持。最后，在该 *C. glutamicum* 菌株中丙酮酸羧化是主要回补途径这一假设已被 *ppc pyk* 双突变株中观察到的生长及赖氨酸生产均减弱所证实。在这种情况下，丙酮酸生成的惟一路线是 PEP：葡萄糖磷酸转移酶系统（PTS），对于输入的每分子葡萄糖，其产生 1 分子的丙酮酸。显然，可用于经丙酮酸羧化而进行 OAA 合成及用于经丙酮酸脱氢酶而进行乙酰辅酶 A 合成可利用的丙酮酸都较少。这就限制了能量和生物合成前体物的产生。由于在与天冬氨酸半醛的缩合以合成赖氨酸的步骤中一定也会有一些丙酮酸流失，因此，在赖氨酸合成阶段这种影响就更为严重。因此，这些数据为丙酮酸羧化活动作为这些菌株中的主回补途径的存在提供了强有力的支持。

转氢酶活性的发现

在这个网络中，有 40 个代谢物参与了总共 39 个反应。这意味着有 39 个未知通量和 40 个方程，原则上，这已足够为系统提供一个惟一解，以及为生化假设和发酵测量结果的总一致性检验提供一个剩余度。然而，在试图求解之前，必须先建立非奇异的，且存在惟一解的化学计量矩阵。例如，如果 PEP 和丙酮酸羧化反应都存在于网络中，则矩阵 **G** 是奇异的，这表明 PEP 羧化通量不能仅根据胞外测量的丙酮酸羧化通量独立确定。当 THD 或 PYK 活性至少有一个存在时，情况也是这样。然而，对于 THD 和 PYK 活性都缺失的菌株，矩阵 **G** 则变为非奇异的，且 PEP 和丙酮酸羧化通量可独立确定。

显然，有很多可能性要考虑，这取决于菌株的遗传背景。表 10.6 总结了关于矩阵 **G** 性质的结果，其对应于 4 个关键酶：PPC、PC、THD 及 PYK 的所有可能排列相对应的 16 种情况。与矩阵奇异性之一起，同时还提供了每种组合的生化可行性的行。由于没有任何菌株可在缺少这两个回补反应的情况下生长，因此，PPC 和 PC 活性都缺失的菌株被认为是不可行的。

对于每个突变株，必须重新构建化学计量矩阵 **G**，以便反映相应的遗传背景和酶反应数据。反映 PYK 活性存在的野生菌，在给予对应于回补反应确切性质适应性的时候，可用 $\mathbf{G}_1$、$\mathbf{G}_2$、$\mathbf{G}_5$、$\mathbf{G}_6$、$\mathbf{G}_9$ 或 $\mathbf{G}_{10}$ 中的任何一个来描述。$\mathbf{G}_1$、$\mathbf{G}_2$、$\mathbf{G}_5$ 是奇异的，因此，对于胞内通量，仅可对 $\mathbf{G}_6$、$\mathbf{G}_9$ 和 $\mathbf{G}_{10}$ 的情况进行求解。从矩阵 $\mathbf{G}_9$ 的结果表明：THD 通量非常高，与糖酵解通量的大小相近。由于这样的高通量并未得到所测 THD 活性的支持，因此，这种情形应排除。不可能根据通量分析来区别 PEP（$\mathbf{G}_6$）羧化途径和丙酮酸（$\mathbf{G}_{10}$）羧化途径的可能性，这是因为这二者都产生同样的误差估计。事实上，除了回补通量是分别通过 PPC，

表 10.6 对于各种途径结构的化学计量矩阵 G 的性质

反　应	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
36(PPC)	+	+	+	+	+	+	+	+	−	−	−	−	−	−	−	−
37(PC)	+	+	+	+	−	−	−	−	+	+	+	+	−	−	−	−
38(PYK)	+	+	−	−	+	+	−	−	+	+	−	−	+	+	−	−
39(THD)	+	−	+	−	+	−	+	−	+	−	+	−	+	−	+	−
矩阵奇异性	S	S	S	N	S	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
生化可行性	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	I	I	I	I

注：考虑了 16 种情况。每种情况包括一组基本反应［包含反应（10.21）～反应（10.23），以及表 10.1 中除 PYK 和 PPC 之外的所有反应］，以及每列中所注明的附加反应。反应（36）表示 PEP 羧化酶的酶反应步骤，反应（37）表示丙酮酸羧化酶的酶反应步骤，反应（38）表示丙酮酸激酶的酶反应步骤，反应（39）为转氢酶的酶反应步骤。缩写：+，反应存在；−，反应不存在；S，矩阵 G 是奇异的；N，矩阵 G 是非奇异的；F，途径在生物化学上是可行的；I，途径在生物化学上是不可行的。

或 PYK 和 PC 之外，这两个背景都给出相同的通量解。这意味着基于 $\mathbf{G}_6$ 和 $\mathbf{G}_{10}$ 的解的任何线性组合都是可能的，即：通过 PEP 羧化和丙酮酸羧化的碳流都是可能的。

对于 *ppc* 突变株，根据前面的结果，以及 ^{13}C-标记研究所提供的进一步支持，主要关注丙酮酸羧化活性存在的情况（$\mathbf{G}_9$～$\mathbf{G}_{12}$）。^{13}C-标记研究表明，这条途径在体内（in vivo）是有效的（Park et al，1997b）。在矩阵 $\mathbf{G}_9$～$\mathbf{G}_{12}$表示的 4 种可能性中，$\mathbf{G}_{11}$和 $\mathbf{G}_{12}$被剔除，因为它们对应于没有 PYR 活性，与测量结果相反。在其余两个可能性 $\mathbf{G}_9$ 和 $\mathbf{G}_{10}$中，$\mathbf{G}_{10}$是最可能的，因为它的总一致性指数的值明显更高。对于 *ppc* 突变株，THD 活性即使有也很小，这个结论得到了体外（in vitro）活性测量结果的支持（表 10.7；Park et al，1997a）。

在 *pyk* 突变株情况下，分析了如下化学计量关系（注意：$\mathbf{G}_3$ 是奇异的，而 $\mathbf{G}_{15}$和 $\mathbf{G}_{16}$不是可行的）：$\mathbf{G}_4$，$\mathbf{G}_7$，$\mathbf{G}_8$，$\mathbf{G}_{11}$及 $\mathbf{G}_{12}$。由于不能满足冗余方程，且产生非常高的一致性指数，要剔除情况 $\mathbf{G}_8$ 和 $\mathbf{G}_{12}$。由于导致 TCA 循环通量为负值，$\mathbf{G}_{11}$的解也要去掉。同样地，由于得到丙酮酸羧化途径的通量为负值，基于 $\mathbf{G}_4$ 的解是不可能的。结果，$\mathbf{G}_7$ 是该突变株最可能的化学计量关系。应注意的是，经 THD 步骤的高通量也到得酶反应数据（表 10.7）的支持。*ppc pyk* 突变株的发酵数据也按类似于分析 *pyk* 突变株的方法进行了分析。类似地，基于 $\mathbf{G}_{11}$的估计是该突变株的最合理解。

表 10.7 *C. glutamicum* ATCC 21253（野生型）和 3 株缺失突变株中所选酶的活性/nmol·g^{-1}（蛋白质）·min^{-1}

菌　株	丙酮酸激酶	PEP 羧化酶	转氢酶	菌　株	丙酮酸激酶	PEP 羧化酶	转氢酶
野生型	822	344	220	Δ*pyk*	n.d①	279	310
Δ*ppc*	677	n.d.	150	Δ*ppc*Δ*pyk*	n.d.	n.d.	490

① n.d. 表示未检测。

为了从实验上证实如同代谢通量分析所建议的 THD 的功能，在这 4 株菌株的粗提物中测量了 THD 活性，这 4 株菌株是在 1L 摇瓶中用 PMB 培养基培养，并在指数期中期收获。表 10.7 的第 4 栏给出了 THD 活性的数据。*pyr* 突变株和 *ppc pyk* 突变株的 THD 活性明显高于其它两株，正如胞内通量分析表明的那样，胞内通量分析显示 PPP 通量和 NADPH 合成速率升高。

应注意的是，通量一致性检验失败表明了 THD 存在，而且也指出：NADPH 积累是所观察到的不一致性的最可能原因。从通量分析得到的其它观察结果是：在 *pyk* 突变株中，

特别是在 *ppc pyk* 突变株中，糖酵解通量显著降低，而 PPP 通量随之升高。对于上述突变株，葡萄糖-6-磷酸异构酶的通量是反向的，而且展现减少的回补通量。最后，在分批发酵过程中，比葡萄糖运输速率减小，ATP 需求也遵从同样的趋势。然而，发现后者在四个菌株中是很相似的，表明这 4 个遗传背景的相对恒定的比代谢能量需求。图 10.9 通过列出这 3 个突变株的最可能途径，概括了本节的分析结果。

10.2 哺乳动物细胞培养中的代谢通量

第 2 个例子是将代谢通量分析用于哺乳动物细胞培养中的能量代谢途径。细胞培养作为生产复杂药物蛋白的重要技术已经出现。在重组产品（在原核细胞中表达的简单非糖基化蛋白质：人生长激素、胰岛素、α-干扰素）第一次浪潮之后，第二代生物技术产品主要集中于生产分泌在哺乳动物培养基中的活性糖基化的复合糖蛋白。用于单克隆生产的中国仓鼠卵细胞（CHO）、BHK 细胞及杂交瘤细胞是最通用的系统。当前，通过哺乳动物细胞生产的一些生物医药已在市场上销售，诸如：促红细胞生成素（EPO）、因子Ⅷ、组织纤溶酶原激活物（TPA）以及粒细胞集落刺激因子（G-CSF）等。还有很多在等待法规批准，有望在不久的将来进入市场。哺乳动物细胞是生产这些分子的装置手段，因此，在过去十年里，它们的重要性迅速上升。

哺乳动物细胞用于范围广泛的复合糖蛋白的生产已变得明显，人们就以极大的努力尝试提高这些系统的培养密度和生产能力。哺乳动物细胞比微生物细胞更加脆弱，而且对生长因子和营养的要求更为苛刻。在哺乳动物细胞培养中获得高生产能力的主要障碍就是在这些系统中可得到的细胞密度低。其主要原因，特别是在分批培养时，是细胞生长期间葡萄糖代谢和谷氨酰胺代谢的抑制性副产物的积累，如乳酸和氨的积累。降低培养基中这些副产物的量有助于得到高细胞密度及产物积累速率的相应增加。由于上述副产物与中央碳代谢直接有关，因此，自然要进行代谢通量分析，并确定导致副产物生成的主要碳水化合物和氨基酸通量的分布。

时常地，细胞培养中的另一个问题是细胞生存力低，特别是细胞密度高时。这是由于程序性细胞死亡（凋亡）的诱导作用。凋亡过程已在工业和实验室观察中，对与能量代谢直接有关的乳酸吸收、丙氨酸及其它代谢产物分泌，进行了广泛的关联。最后，大量观察结果表明了葡萄糖利用率作为分泌产物质量的决定因子的重要性，特别是因为产物质量与糖基化位点占用率有关。糖基化反应中的糖利用率是一个问题，它可通过分析 6-磷酸葡萄糖分支点的碳通量分布来阐明。Glc6P 是进入戊糖磷酸途径的主要入口点，该途径为完全糖基化蛋白的生产提供碳前体。胞内通量的确定，特别是当与胞内代谢物浓度和酶活性结合在一起时，可提高我们对这些细胞中蛋白质糖基化的理解。

10.2.1 胞内通量的确定

本节将总结对杂交瘤细胞系 ATCC CRL 1606［其产生抗人纤连蛋白的免疫球蛋白 G (IgG)］进行代谢通量分析所做的工作。将说明如何从细胞培养数据来估计这些通量，以及如何通过比较预测的同位素富集度与在细胞培养基中加入^{13}C-标记的葡萄糖之后在分泌的乳酸中所测的同位素分布来进一步证实这些通量。杂交瘤细胞是采用标准的 DMEM 培养基 (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) 在 2L 充分搅拌的 Celligen 生物反应器中进行培养的。有关实验规程的详情可查看原文（Zupke and stephanopoulos，1994；Zupke et al，1995)。表 10.8 列出了两个不同实验中所测的代谢物。在实验 1 中，当细胞浓度为 4.8×10^5 个细胞·mL^{-1}时加

入标记葡萄糖，而且乳酸盐允许积累 20h。在实验 2 中，细胞浓度为 6.8×10^5 个细胞·ml^{-1}时加入葡萄糖，允许乳酸盐积累 10h。两次实验数据如表 10.8 的两列所示。

表 10.8　在用于代谢通量估计的杂交瘤细胞培养中所测的速率

代谢物	实验 1	实验 2	代谢物	实验 1	实验 2
葡萄糖	−2.92±0.16	−3.9±0.19	生物质	3.71±0.19	3.97±0.20
丙氨酸	0.31±0.03	0.31±0.03	O_2	−2.0±0.2	−2.0±0.2
乳酸盐	6.2±0.32	7.03±0.35	CO_2	2.6±0.3	2.6±0.3
谷氨酰胺	−0.86±0.09	−1.1±0.1	IgG	0.96±0.1	0.99±0.1
NH_3	0.73±0.07	−0.70±0.07			

注：所有速率以 10^{-10}mmol·(细胞$^{-1}$)·h^{-1}表示。负号表示消耗，生物质和 IgG 的单位分别是以 C-mol 和 N-mol 表示。

通过向生物反应器液面上空间通入氮气，并监测溶解氧浓度（c_o）从 60% 衰减至大约 20%，对氧比吸收速率 r_{O_2} [mmol·(细胞$^{-1}$)·h^{-1}] 进行动态测量。下式用来计算氧比吸收速率，其中传质系数 k_La 是单独测量的：

$$\frac{dc_o}{dt}=k_La(c_o^*-c_o)-r_ox \tag{10.24}$$

式中，c_o^* 为与气相平衡时的溶解氧浓度；x 为生物反应器中的细胞浓度。

在哺乳动物细胞培养中，由于在培养基中用碳酸氢盐控制 pH，总 CO_2 产生速率的测量因而变得复杂。由于 CO_2/碳酸氢盐相互作用，液相中可能有 CO_2 积累或损失，其不能由出口气中 CO_2 浓度的测量所检测。在细胞培养基常见的条件下，碳酸氢盐更易生成；然而，在高通气速率下，会存在 CO_2 的汽提。为了正确计算 CO_2 的总生产速率（CPR），水相中 CO_2 的积累速率必须加上气相 CO_2 的挥发速率。CO_2 挥发速率（CER）是按 $F(c_{out}-c_{in})$ 测量的，此处 F 为气体流速，c_{in}和 c_{out}分别是生物反应器进出气流中的 CO_2 浓度。通过使用没有 CO_2（即：$c_{in}=0$）的瓶装气体，将排出的气体通入饱和碳酸钙溶液中，并测量溶液的 pH 值，这样就可测量排出气流中的 CO_2 浓度。在平衡时，碳酸钙溶液的 pH 值与气相中的 CO_2 浓度成线性关系。液相 CO_2 浓度是这样测量的：将没有细胞的样品在 4℃ 下存放，并用测定试剂盒酶法测量 CO_2/碳酸氢盐的总浓度。在杂交瘤细胞的分批培养期间（大约 3.5d），发现液相 CO_2 浓度变化非常显著：首先是由于通气气体的汽提效应而降低，然后是因细胞呼吸导致的 CO_2 连续积累而上升。胞外代谢物的比生成速率是通过测量相对短的时间（10～15h）内的胞外代谢物浓度来确定的，以致培养条件和细胞代谢没有显著变化。根据下式，对浓度数据进行最小二乘法拟合：

$$c_s=c_{s,0}+\frac{r_sx_0}{\mu(e^{\mu t}-1)} \tag{10.25}$$

式中，c_s 为测量浓度；$c_{s,0}$为代谢物的初始浓度（即 10～15h 测量期起始的浓度）；r_s 为代谢物的单位吸收速率或单位消耗速率；x_0 为细胞初始浓度；μ 为细胞比生长速率。在谷氨酰胺情况下，考虑到谷氨酰胺自发分解产生氨，上式要进行改进。

在深层培养中，哺乳动物细胞的主要碳源和能量是葡萄糖和谷氨酰胺。谷氨酰胺也作为主要的氮源。在杂交瘤细胞中，也要消耗谷氨酰胺之外的其它氨基酸，而且它们的消耗量可接近谷氨酰胺的 50%。然而 80% 以上的消耗量是用于蛋白质合成，因此，谷氨酰胺之外的氨基酸对产能的贡献非常少。添加成分，如维生素、微量元素以及生长因子对细胞生长有显著作用，但对能量代谢的贡献非常小。葡萄糖和谷氨酰胺代谢的主要产物是生物质、以抗体

形式分泌的蛋白、能量、用于生物合成的还原能力、二氧化碳、废产物乳酸和氨。此外，根据细胞系和生长条件不同，也可能分泌天冬氨酸、丙氨酸、谷氨酸。与正常组织相反，培养的细胞倾向于展现出高速率的好氧糖酵解。这是葡萄糖经糖酵解代谢为丙酮酸的结果。葡萄糖也可经戊糖磷酸途径代谢产生 NADPH 和生物合成中间体。丙酮酸可转化在 TCA 循环中被分泌、被氧化的乳酸，或经转氨作用形成丙氨酸。此外，丙酮酸也可通过回补途径而被羧化，或通过苹果酸酶反应而合成回丙酮酸。在许多转化细胞和肿瘤细胞中，胆固醇的合成被提高，膜组成的改变可能有助于其通常展现的已改变的代谢。然而，CRL 1606 通常将 90% 以上所消耗的葡萄糖转化为乳酸，这表明碳从乙酰辅酶 A 到胆固醇合成没有明显的分流。在生物质合成方程式中，要把脂质的合成考虑进去，但在计算乳酸中的^{13}C分布时，不予考虑。谷氨酰胺可以结合进生物质中，或经 TCA 循环氧化。已经发现在很多细胞系中，谷氨酰胺是主要的能源。对于 CRL 1606 杂交瘤细胞，葡萄糖和谷氨酰胺是主要的能源，而氨、乳酸及丙氨酸是主要的产物。

图10.10和表10.9分别描述和总结了哺乳动物细胞中的能量代谢生物化学。通过将出

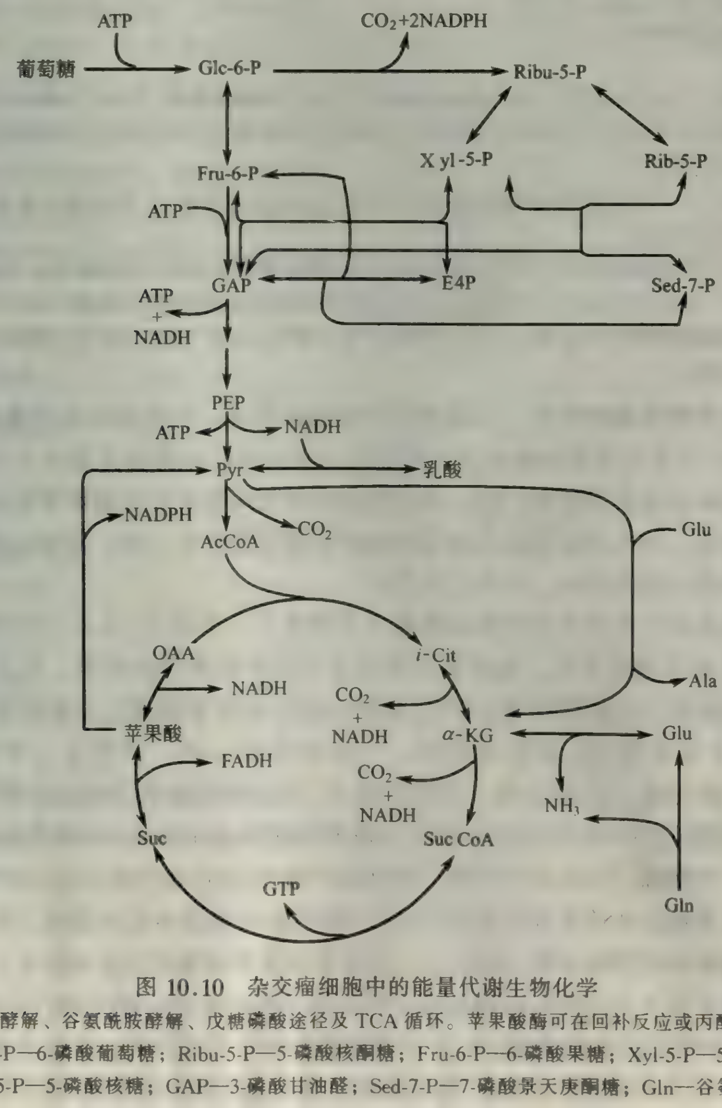


图 10.10 杂交瘤细胞中的能量代谢生物化学

代谢途径包括糖酵解、谷氨酰胺酵解、戊糖磷酸途径及 TCA 循环。苹果酸酶可在回补反应或丙酮酸合成中起作用

缩写：Glc-6-P—6-磷酸葡萄糖；Ribu-5-P—5-磷酸核酮糖；Fru-6-P—6-磷酸果糖；Xyl-5-P—5-磷酸木酮糖；Rib-5-P—5-磷酸核糖；GAP—3-磷酸甘油醛；Sed-7-P—7-磷酸景天庚酮糖；Gln—谷氨酰胺

表 10.9 描述杂交瘤细胞中能量代谢的反应组

1. 葡萄糖 + ATP→6-磷酸葡萄糖 + ADP
2. 6-磷酸葡萄糖→6-磷酸果糖
3. 6-磷酸果糖 + ATP→2-三磷酸甘油醛 + ADP
4. 三磷酸甘油醛 + 2ADP + NAD→丙酮酸 + NADH + 2ATP
5. 丙酮酸 + NADH→乳酸 + NAD
6. 6-磷酸葡萄糖 + 2NADP→5-磷酸核酮糖 + 2NADPH + CO_2
7. 5-磷酸核酮糖→5-磷酸木酮糖
8. 5-磷酸核酮糖 + 5-磷酸木酮糖→7-磷酸景天庚酮糖 + 三磷酸甘油醛
9. 7-磷酸景天庚酮糖→6-磷酸果糖 + 4-磷酸赤藓糖
10. 5-磷酸木酮糖 + 4-磷酸赤藓糖→6-磷酸果糖 + 三磷酸甘油醛
11. 丙酮酸 + 苹果酸 + 3NAD→α-KG + 3NADH + $2CO_2$
12. α-KG + 2NAD + ADP→2NADH + CO_2 + ATP + 苹果酸
13. 谷氨酰胺→谷氨酸 + NH_3
14. 丙酮酸 + 谷氨酸→丙氨酸 + α-KG
15. 谷氨酸 + NADP→α-KG + NADH + NH_3
16. 2NADH + 6ADP + O_2→2NAD + 6ATP
17. 苹果酸 + NADP→丙酮酸 + CO_2 + NADPH
18. ATP→ADP
19. 0.036 谷氨酰胺 + 0.062 谷氨酸 + 0.0031 6-磷酸葡萄糖 + 0.013 5-磷酸核酮糖 + 0.042 三磷酸甘油醛 + 123 丙酮酸 + 0.019 苹果酸 + 0.74ATP + 0.188NADPH + 0.23NAD→生物质 + 0.072α-KG + 0.23NADH + 0.12CO_2 + 0.74ADP + 0.188NADP
20. 0.012 谷氨酰胺 + 0.07 谷氨酸 + 0.04GAP + 0.011NADPH + 0.012 苹果酸 + 0.082NAD→抗体 + 0.082NADH + 0.057α-KG + 0.011NADP

注：在反应 12（TCA 循环的一部分）中，FAD 已用 NAD 代替，所产生的 GTP 已省略。由于通过电子传递链，一个 NADH 可产生三个 ATP，$FADH_2$ 可以产生两个 ATP，因此，产生了正确的 ATP 当量数。缩写：FAD—黄素腺嘌呤二核苷酸；NAD—烟酰胺腺嘌呤二核苷酸；GTP—鸟嘌呤核苷三磷酸；ADP—腺嘌呤核苷二磷酸；GAP—三磷酸甘油醛；α-KG—α-酮戊二酸。

现在反应链中的中间代谢物归并，代谢网络已经得到简化。代谢途径提供能量（ATP）、还原力（NADPH）以及生物质和抗体合成的前体。所归并的方程也为遵从 2.5 节所述步骤的生物质合成和抗体合成提供准备。即：通过使用从生化网络中存在的前体合成大分子的反应推导出这些方程式，并与描述细胞大分子组成的方程式组合在一起。典型的蛋白质组成已假定适合于这些细胞分泌的抗体，如表 2.8 所示。

通过使用来自两个不同实验的速率数据（详情见下一节和表 10.8），可以得到表 10.10 的胞内通量。在 95% 置信水平，随机测量误差足以解释数据中的差异。对于本研究中存在的三个冗余测量结果，一致性指数（CI）小于 7.81。这再次强调，一致性指数对于识别错误测量结果是非常有用的。在本研究中，一致性指数（CI）识别了二氧化碳产生速率（CPR）测量中的问题。已经发现，采用直接从 CO_2 释放速率（CER）测量结果得到的 CPR 值会产生显著的不一致性，它可通过去掉测量速率表中的 CER 来消除。这表明 CER 是过失误差的一个来源，实际上已发现，这是由于液相 CO_2 和气相 CO_2 之间的相互作用造成的。正如前面所述，在计算真实的 CPR 时，把 CO_2 积累速率包含在内，则可修正误差。

胞内通量是在不同溶氧水平上确定的，并用来评价氧对细胞代谢的影响。表 10.11 总结了最重要的通量及其不确定性。丙酮酸到 TCA 循环的通量在正常溶解氧水平时是显著的，而在 1% 溶解氧水平时仅为很小的正值，在氧限制条件下基本为零。通过丙氨酸转氨酶的通量在各种溶氧水平下大致不变。通过谷氨酸脱氢酶的通量在60%溶氧水平时为正，而在低

表 10.10　从测量的速率估计杂交瘤培养中的通量/10^{-10}mmol·(细胞)$^{-1}$·h^{-1}

反　应	实验 1	实验 2	反　应	实验 1	实验 2
1	3.18±0.11	3.91±0.13	11	0.211±0.060	0.203±0.060
2	2.85±0.11	3.54±0.13	12	0.922±0.063	0.925±0.063
3	3.03±0.11	3.74±0.13	13	0.683±0.036	0.691±0.036
4	5.96±0.22	7.38±0.26	14	0.314±0.031	0.318±0.031
5	0.315±0.028	7.00±0.26	15	0.073±0.039	0.054±0.038
6	0.315±0.028	0.355±0.029	16	1.88±0.17	1.92±0.17
7	0.178±0.018	0.202±0.019	17	0.629±0.036	0.634±0.037
8	0.089±0.010	0.101±0.010	18	15.2±1.1	16.6±1.2
9	0.089±0.010	0.101±0.010	19	3.69±0.18	4.01±0.20
10	0.090±0.010	0.101±0.010	20	0.961±0.096	0.999±0.099

注：反应号指表 10.9 中的生化反应。数据取自 Zupke and Stephanopoulo (1995)。

溶氧水平时为负。如表 10.11 所示，从通量也可计算一些有趣的参量。当溶氧减小时，产生的总 ATP 从 1.95pmol·(细胞)$^{-1}$·h^{-1}降低到 1.58pmol·(细胞)$^{-1}$·h^{-1}，变化不是太明显。这使人想到在微生物细胞情况下所得的结果，即：ATP 的比生成速率似乎与培养条件确实无关。当溶解氧下降时，不断增加的 ATP 从葡萄糖产生，而且平行于糖酵解产生的 ATP 分数，糖酵解产生的 ATP 分数从 0.34 增加到 0.69。所得的结果也表明：溶解氧对氮代谢和通过谷氨酸脱氢酶的通量具有显著影响。在低溶解氧水平时，谷氨酸脱氢酶逆转反应方向，从而有利于谷氨酸形成。通过通量分析，弄清楚了一些东西，并指出胞内氧化/还原在细胞生理学中的基本作用，以及通过溶氧调节控制生理过程的可能性。

表 10.11　根据杂交瘤培养中所测量的胞外代谢物变化的速率计算的所选通量的估计值/mol·(细胞)$^{-1}$·h^{-1}

反应/参量	通　　量		
	DO=0	DO=1%	DO=60%
进入 TCA 循环的丙酮酸	0.0±0.3	0.28±0.3	0.94±0.28
丙酮酸至丙氨酸	0.33±0.3	0.26±0.2	0.33±0.3
谷氨酸经 GDH 至 α-酮戊二酸	−0.29±0.3	−0.14±0.2	0.4±0.3
苹果酸至丙酮酸	−0.24±0.3	0.41±0.3	0.59±0.4
总 ATP/pmol·(细胞)$^{-1}$·h^{-1}	1.58	1.67	1.95
糖酵解产生的 ATP 分数	0.69	0.5	0.34
来自葡萄糖的 ATP 分数	0.85	0.75	0.67
来自葡萄糖的乳酸分数	0.99	0.98	0.96
用于维持的 ATP 分数	0.29	0.46	0.62

注：总 ATP 生产与各种途径的贡献及维持反应所消耗的没有考虑的 ATP 量同时给出。数据取自 Zupke et al (1995)。

10.2.2　通过^{13}C 标记研究证实通量估计

为了证实通过物质平衡所得的通量估计，^{13}C 标记葡萄糖作为一个特定探针用于细胞培养基中。与 Walsh 和 Koshland (1984) 在研究大肠杆菌中的乙醛酸支路时使用的方法类似，将测得的乳酸中的同位素分布与从胞内通量估计所预测的进行比较。还要注意的是，对于一组给定的胞内通量（例如，通过物质平衡确定的），以及从反应物到产物的碳原子作图的途径，可以对代谢网络中的全部代谢物确定稳态同位素分布。选择可以从代谢通量中作出辨别的标记底物是很重要的。已经发现，如果葡萄糖用作标记化合物，则分泌的乳酸的三个碳位上的^{13}C 富集度明显取决于胞内通量。具体地，分泌的乳酸中的同位素富集度分布是两个通

量比 f_1（糖酵解产生的丙酮酸分数）和 f_2（从谷氨酸衍生的 α-酮戊二酸分数）的函数。

标记实验是这样进行的：先让细胞在未标记葡萄糖上生长一短暂时间，一旦达到指数期，则将 1g99％［1-^{13}C］葡萄糖加入到生物反应器中。10h 或 20h 之后收集培养基，通过离心除去细胞。上清液通过冷冻干燥进行浓缩，并进行 NMR 分析。得到关于乳酸 3 个碳原子的富集度的 NMR 数据。它们被表示为 C1∶C2 和 C3∶C1 富集度之比，结果如表 10.12 所示。同位素富集度比可用来与富集度预测值比较，从而减小基线变化所造成的误差。

表 10.12　为了证实通过物质平衡方法确定的杂交瘤代谢通量而进行的两个标记实验的同位素富集度数据

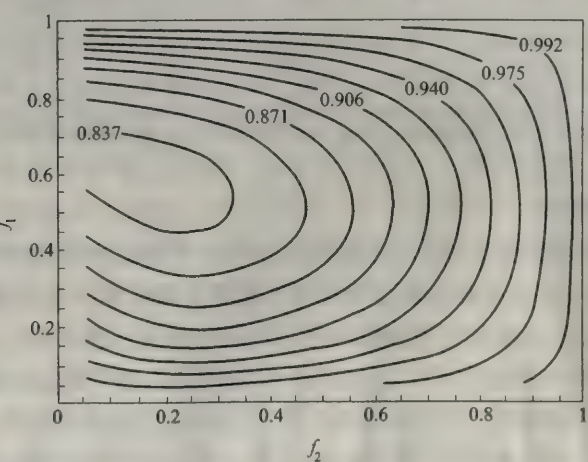
参　　量	实验 1	实验 2
^{13}C 比，乳酸的 C1∶C2①	0.98±0.01	0.98±0.01
^{13}C 比，乳酸的 C3∶C1②	3.5±0.11	3.0±0.09
未标记乳酸的分数	0.39±0.02	0.55±0.03
标记葡萄糖的分数	0.115±0.006	0.117±0.006
糖酵解产生的丙酮酸分数(f_1)	0.905±0.006	0.921±0.005
来自谷氨酸胺的 α-KG 分数(f_2)	0.77±0.05	0.78±0.05

① 在估计 C1∶C2 比时，这两个实验的误差概率分别是 16％和 0.5％。

② 在估计 C3∶C1 比时，这两个实验的误差概率分别是 5％和 1％。

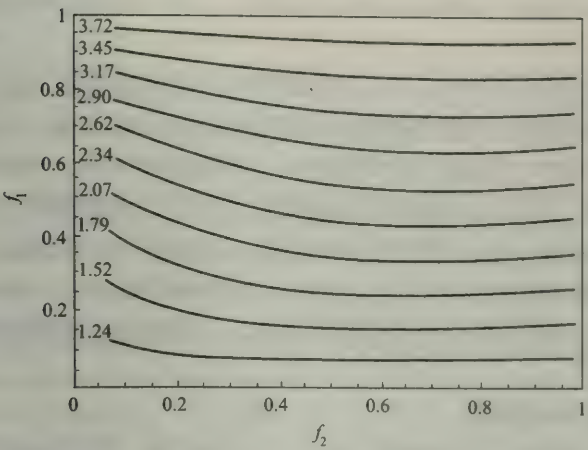
注：3 个乳酸的^{13}C 峰面积已定量，并用来计算富集度比。葡萄糖和乳酸的富集度是通过测量标记葡萄糖加入前后的浓度来确定的。通量比 f_1 和 f_2 是根据代谢网络化学计量和代谢物速率变化的测量结果来估计的。数据取自 Zupke et al (1995)。

实验测得的同位素富集度可与由所分泌的代谢物物质平衡从胞内通量计算所得结果进行比较。一般地，f_1 和 f_2 这两个通量比足以确定乳酸的^{13}C 富集度。图 10.11 和图 10.12 表示了^{13}C 乳酸富集度比对这两个通量比的依赖性。这两个图表明，恒富集度比的计算等值线是 f_1 和 f_2 的函数。一个单个同位素比将通量比限制在一条等值线上，但并不能惟一地决定 f_1 和 f_2。这两个通量的确定需要测量两个相互独立的同位素比，然后在图 10.11 和图 10.12 所示曲线簇中的两条等值线相交处确定 f_1 和 f_2。通过使用图 10.11 和图 10.12 中的等值线，并直接与实验测定的同位素比值比较，则可按相反的顺序，利用 f_1 和 f_2 来确定同位素比 C1∶C2 和 C3∶C1。因此，分泌的乳酸中的同位素富集度测量结果既可用来证实其它方式得到的胞内通量估计值，也可用来直接确定图 10.11 与图 10.12 等值线相交处的胞内通



C1∶C2 比是 f_1 和 f_2 的函数。C1 和 C2 分别是乳酸第 1 位和第 2 位碳原子上的^{13}C 的数量。通量比 f_1 是糖酵解产生的丙酮酸的分数，而 f_2 是从谷氨酸衍生的 α-酮戊二酸的分数。等值线是通过计算机模拟生化网络计算的。生化网络采用的实验条件为 11.5％的葡萄糖在第一位碳标记有^{13}C，39％的积累乳酸未富集。改自 Zupke 和 Stephanopoulos (1994)

图 10.11　杂交瘤培养实验 1 中，乳酸中的恒定 C1∶C2 比的等值线

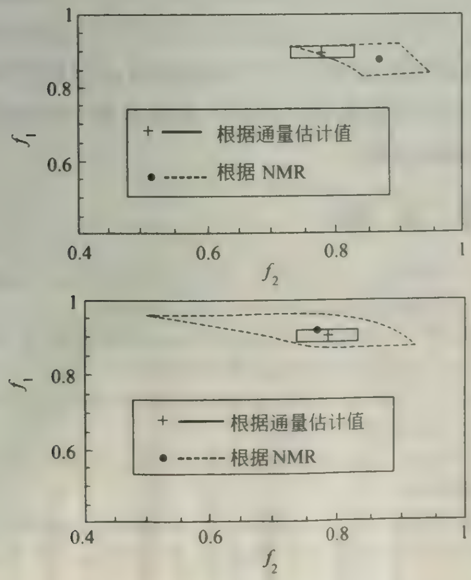


C3∶C1 比是 f_1 和 f_2 的函数。C3 和 C1 分别是乳酸第 3 位和第 1 位碳原子上的 ^{13}C 的数量。通量比 f_1 是糖酵解产生的丙酮酸的分数，而 f_2 是从谷氨酸衍生的 α-酮戊二酸的分数。等值线是通过计算机模拟生化网络计算的。生化网络采用的实验条件为 11.5%的葡萄糖在第一位碳标记有 ^{13}C，39%的积累乳酸未富集。改自 Zupke 和 Stephanopoulos（1994）

图 10.12　杂交瘤培养实验 1 中，乳酸中的恒定 C3∶C1 比的等值线

量比。应注意的是，虽然可在单个同位素比情况下证实胞内通量，但胞内通量的确定通常要求测量一个以上的同位素比。此外，鉴于图 10.11 和图 10.12 中等值线的形状，通过联合使用一个以上的同位素比测量，通量证实的精确度将显著提高。

图 10.13 表示将测量的同位素比与根据代谢通量估计值预测的同位素比进行比较时实验 1 和实验 2 的结果。图中显示了对应于两个测量的同位素比及其估计的不定性（±1 标准偏差）的等值线交点。此外，图中还给出了通过物质平衡计算的通量比及其不定性。虽然根据 NMR 得到的通量比的估计值具有较大的不定性，但两种方法之间具有良好的一致性。为了检验一致性的统计显著性，要进行两个检验。首先，要检验计算的比值和测得的比值是相同的这个假设，并发现在 90%置信区间内这个假设是成立的。其次，要检验比值相差一个以上的指定增量这个假设。选择的增量要对应于 f_1 或 f_2 的 20%差数。对于 C1∶C2 和 C3∶C1，增量分别等于 0.04 和 0.4。在表 10.12 中所示误差概率的情况下，可以否定测量的比值和



f_1 和 f_2 是在杂交瘤培养中根据乳酸 ^{13}C 同位素比，以及根据采用物质平衡和胞外测量所做的通量估计而得到的。恒比 C1∶C2 和 C3∶C1 这两条等值线的交点，根据分泌乳酸中的 ^{13}C 体外（in vitro）NMR 测量来确定 f_1 和 f_2。虚线表示对应于 NMR 测量的正或负标准偏差的等值线，实线表示根据估计的胞内通量计算的通量比中的不确定度。上图为实验 1，下图为实验 2。改自 Zupke 和 Stephanopoulos（1994）

图 10.13　通量比 f_1 和 f_2 的比较

计算的比值相差几个增量这个假设。从这一点可以得出以下结论：NMR 测量结果与根据通量预测的比值具有良好的一致性。

这个例子说明了应用标记实验是如何有利地证实通过物质平衡得到的通量图。应注意的是，标记底物的选择对根据同位素富集度来对胞内通量进行定量的能力，特别地，区分不同底物的贡献等具有重要影响。在本例中，采用了两个乳酸比。正如在图 10.12 中看到的，C3:C1 比的测量结果对 f_1 的值敏感，但对 f_2 的值相当不敏感。将 C3:C1 比测量结果与C1:C2 比的测量结果组合在一起可以修正这一点。类似的分析表明：采用标记谷氨酰胺可以较好地确定 f_2，这是因为谷氨酰胺更直接地包含在反应分开时，并导致乳酸标记。标记谷氨酰胺与标记葡萄糖同时使用会得到一个区分胞内通量的更好系统，并提高标记比期望值和测量值之间的一致性精度。

10.2.3 通量分析在细胞培养基设计中的应用

在上节中，给出了生物质合成及抗体合成的归并方程式。应注意的是，除了方程式中确认的代谢物之外，生物质合成还需要其它营养，它们不能从基本的碳水化合物源和谷氨酰胺源中获取。这样的营养，譬如必需氨基酸，它们作为培养基中的添加成分而被提供。尽管一些营养成分可以从葡萄糖和谷氨酰胺合成，但在培养基中应加入它们，从而尽量减少用于合成它们的葡萄糖和谷氨酰胺的消耗量。例如，典型细胞培养基中已知的非必需氨基酸就是这种情况，它们可以从培养基中的谷氨酰胺衍生出来。这对氨的产生会有不良影响，氨在培养基中积累，并最终引起细胞培养过程的结束。通过向培养基中补充那些可以从谷氨酰胺衍生的非必需氨基酸，可以减少谷氨酰胺在培养基中的用量，从而降低氨的积累量。这种方法已用于开发哺乳动物培养基的新配方（Xie and Wang，1996）。该配方反映了基于生物质合成和抗体合成的一般方程式的准确的化学计量平衡。培养基配制的准则是：(a) 提供生物质合成和抗体合成所需的全部营养成分；(b) 在培养基中按化学计量平衡补充非必需氨基酸，尽量减少用于非必需氨基酸合成的谷氨酰胺量；(c) 供给按化学计量平衡的培养基，以便培养基中的葡萄糖浓度保持在限制水平，以及培养基的渗透压在加料过程中不会发生显著变化。

作为按化学计量平衡的培养基与上述补料策略的组合运用的结果，在 CRL 1606 培养中的细胞密度和产品滴度大幅提高。细胞生长达到密度为每毫升几百万个，抗体积累达到 2.4g/L 的特别水平。发现该抗体的生产与活细胞总数乘以它们在生物反应器培养基中的存在时间直接相关。当然意味着抗体的比生产速率在细胞密度低时，或非常高时是恒定的，这是细胞培养技术所有开发努力中一个非常重要的发现。

参 考 文 献

Henriksen, C. M., Christensen, L. H., Nielsen, J. & Villadsen, J. (1996). Growth energetics and metabolic fluxes in continuous cultures of *Penicillium chrysogenum*. *Journal of Biotechnology*. **45**, 149-164.

Jørgensen, H., Nielsen, J. Villadsen, J. & Møllgaard, H. (1995). Metabolic flux distributions in *Penicillium chrysogenum* during fed-batch cultivations. *Biotechnology and Bioengineering* **46**, 117-131.

Nissen, T. L., Schulze, U., Nielsen, J. & Villadsen, J. (1997). Flux distributions in anaerobic, glucose-limited continuous cultures of *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology* **143**, 203-218.

Park, S. M., Sinskey, A. J. and Stephanopoulos, G. (1997a). Metabolic and physiological studies of *Corynebacterium glutamicum* mutants. *Biotechnology and Bioengineering* **55**, 864-879.

Park, S. M., Shaw-Reid, C., Sinskey, A. J. & Stephanopoulos, G. (1997b). Elucidation of anaplerotic pathways in *Corynebacterium glutamicum* via ^{13}C-NMR spectroscopy and GC-MS. *Applied Microbiology and Biotechnology* **47**, 430-440.

Takiguchi, N., Shimizu, H. & Shioya, S. (1997). An online physiological-state recognition system for the lysine

fermentation process-based on a metabolic reaction model. *Biotechnology and Bioengineering* **55**: 170-181.

Vallino, J. J. (1991). Identification of branch-point restrictions in microbial metabolism through metabolic flux analysis and local network pertubations. Ph. D. thesis, MIT, Cambridge, MA.

Vallino, J. J. & Stephanopoulos, G. (1993). Metabolic flux distributions in *Corynebacterium glutamicum* during growth and lysine overproduction. *Biotechnology and Bioengineering* **41**, 633-646.

Vallino, J. J. & Stephanopoulos, G. (1994a). Carbon flux distribution at the glucose 6-phosphate branch point in *Corynebacterium glutamicum* during lysine overproduction. *Biotechnology Progress* **10**, 327-334.

Vallino, J. J. & Stephanopoulos, G. (1994b). Carbon flux distribution at the pyruvate branch point in *Corynebacterium glutamicum* during lysine overproduction. *Biotechnology Progress* **10**, 320-326.

van Gulik, W. M. & Heijnen, J. J. (1995). A metabolic network stoichiometry analysis of microbial growth and product formation. *Biotechnology and Bioengineering*. **48**, 681-698.

Walsh, K. & Koshland, D. E. (1984). Determination of flux through the branch point of two metabolic cycles-The tricarboxylic acid cycle and the glyoxylate shunt. *Journal of Biological Chemistry* **259**, 9646-9654.

Xie, L. & Wang, D. I. C. (1996). Material balance studies on animal cell metabolism using a stoichiometrically based reaction network. *Biotechnology and Bioengineering* **52**, 579-590.

Zupke, G. & Stephanopoulos, G. (1994). Modeling of isotope distributions and intracellular fluxes in metabolic networks using atom mapping matrices. *Biotechnology Progress* **10**, 489-498.

Zupke, G., Sinskey, A. J. & Stephanopoulos, G. (1995). Intracellular flux analysis applied to the effect of dissolved oxygen on hybridomas. *Applied Microbiology Biotechnol*. **44**, 27-36.

第 11 章　代谢控制分析

代谢工程的一个最重要目的是阐明负责通量控制参数的意义。在前述章节中，描述了如何通过胞内代谢的质量平衡和包括同位素标记在内的更专一化的方法来确定代谢通量。代谢通量分析（MFA）的概念，对于研究不同代谢途径之间的相互作用和量化围绕代谢分支点的通量分布是很有用的。然而，MFA 本身并不能给我们提供任何通量控制的定量的度量标准。通量控制对于保持代谢物的合成和转化速率的严格平衡是很重要的，该平衡要覆盖非常广泛的外部条件，而使胞内代谢物的浓度不会发生剧烈的上升或下降。此外，正确理解通量控制对代谢通量的合理调整也是很重要的，这种合理的调整正是代谢工程的主要目的。在 20 世纪 50 年代，反馈抑制、协同性、酶的共价修饰作用以及酶的合成控制机理的发现揭示了若干分子机制，这些机制在通量控制中起着重要的作用。由于在通量控制方面存在形形色色的机制，对于一个给定的代谢途径，在其通量是如何被控制的问题上存在许多争论就不足为奇了。因为大部分关于酶的控制的研究报道主要是定性的（例如："果糖磷酸激酶是肌肉细胞中糖酵解途径的主要通量控制酶。" Voet and Voet，1990），所以对大量的有关通量控制的研究结果的重要性进行评估是很困难的。在许多情况下，这些研究结果之间似乎有相互矛盾之处。在讨论通量控制时，关于限速步骤和关键酶的陈述以及参考文献大量存在。对这些可能以不同的方式进行解释，这经常导致关于控制代谢中这些反应步骤实际作用的误解。例如：早期发现，一条代谢途径中第一个酶，或者在一个分支点后的第一个酶受到某种类型的调节（如反馈抑制）。这往往导致如下说法："在一条代谢途径中的第一步反应是限速步骤"，而这并不一定是正确的。

在酶动力学相互作用和通量控制通常的定性处理中，代谢控制分析（MCA）的引入帮助其建立一些严密性。此外，它还对通量控制中重要代谢参数的系统评价及描述提供了一个有用的框架。从本质上说，MCA 是代谢网络酶动力学本身非线性问题的一种线性扰动理论。因此，MCA 的预测在性质上是局部的，任何外推至多是尝试性的。尽管有这些局限性，MCA 在如下方面已表明是很有用的：提供各单个反应代谢通量控制的度量标准，阐明酶反应网络中速率控制步骤的概念，描述酶活性对于胞内代谢物浓度的影响，联系局部的酶动力学和系统的代谢行为。

MCA 的概念是在 Kacser 和 Burns（1973）以及 Heinrich 和 Rapoport（1974）发表的两篇具有里程碑意义的文章中提出来的，它们均是对 Higgins（1963，1965）关于这方面思想的发展。另外两种用于代谢控制定量研究的框架——生化系统理论（Biochemical Systems Theory 见方框 11.1）及 Crabtree 和 Newsholme 提出的通量定向理论（flux-oriented theory，Crabtree and Newsholme，1987a，b）具有许多相似之处。虽然最初的注意力集中于这三种方法的不同点，后来人们认识到尽管形式不同，但它们确实汇聚于同样的概念。在本章中，将描述 MCA 的基本思想及其结果，由于其更偏向于描述代谢网络的通量控制。

方框 11.1　生化系统理论

由 Savagean 在 20 世纪 60 年代后期提出的生化系统理论用于处理复杂系统的模型模拟问题，其中这些系统之间也许存在许多不同程度上的相互作用。它的出发点是反应速率可用如下类型的常规幂函数表达式：

$$v_i = \alpha_i \prod_j X_j^{g_{ij}} \tag{1}$$

式中，X_j 是系统变量（如代谢物浓度、酶活性和效应物浓度等）；参数 α_i 和 g_{ij} 分别是表观速率常数和表观动力学级数。式（1）可被看作为非线性动力学在对数坐标上的线性化。由于大多数生化反应都是非线性的，因此该式对反应动力学的近似化程度要比线性方程更好。按照这种理论，所有产生代谢物 X_j 的反应都组合进一个净速率为 v_i 的单个反应。同样，所有消耗同一代谢物的反应也都组合进一个净速率为 v_{-i} 的单个反应。这些所组合的反应中每一个反应的速率由幂函数方程近似表达。依据所有代谢物的质量平衡可以列出一个微分方程系统用于详细研究其控制特性，这种系统被称为协同系统，或 S-系统。

生化系统理论（BST）是一种对复杂系统进行模型模拟的极好方法，利用从模型与实验数据拟合所确定的参数，它也可以被用来获取关于通量控制的信息。从这一点来说，BST 可被当作一个通用的理论，而 MCA 代表一种适用于线性化的系统的一个特例（Savageau，et al，1987a，b）。这已是一个经常争论的问题（Discussion Forum，1987；Savageau，et al，1987a；Kacser，1991），很可能反映 MCA 的目的和假定的一个误解（Cornish-Bowden，1989）。这里，BST 的目的是建立动力学模型，以便对途径中的通量进行量化，其不仅适用于稳态，也适用于非稳态条件；MCA 的基本目的是借助于定量的参数对代谢控制讨论中所用概念赋予明确的意义。为了支持其观点，Savageau 等（1987a，b）已表明可由 BST 的方程推导出 MCA 基础方程（后面所要讨论的加和定理和连接定理），MCA 中的参数也可从幂函数表达式中的动力学参数中获得。然而这种比较是基于另一种误解，即：MCA 参数（控制系数和弹性系数）是常数，这根本不需要（Cornish-Borden，1989）。

11.1　代谢控制分析的基础

代谢控制分析仅能严格地应用于稳态条件（或拟稳态条件），一个基本假定是：一个稳定的稳态是由一条代谢途径中催化各个单一步骤的酶的活性所惟一定义。因此酶活性同代谢途径中第一个反应的底物和最后一步反应的产物的浓度一起被当作系统参数。通过控制环境条件（例如，在一个处于稳态的恒化器中）或作为细胞内调节的结果，可使该途径第一个底物和最终产物的浓度保持恒定。在原则上，系统参数可被任意改变，因此它们完全规定了该系统。由这些参数值所确定的性质，例如，通过途径的通量或中间代谢物的浓度，被作为系统变量。

为了举例说明酶动力情况下参数和变量的定义，可以考虑一个简单的两步途径，该途径中底物 S 通过中间产物 X 转变为产物 P：

$$\mathrm{S} \overset{E_1}{\longleftrightarrow} \mathrm{X} \overset{E_2}{\longleftrightarrow} \mathrm{P} \tag{11.1}$$

在稳态下 S 转变为 P 的净速率由 J❶ 给出。显然，一个稳态由系统参数，即酶的活性水平 E_1 和 E_2 及底物 S 和产物 P 的浓度惟一确定。稳态的定义决定了必须对中间代谢物浓度 c_X、通量 J 和其它导出量进行测定。如果系统参数改变了，例如，如果 E_1 增加了，则将出现一个新的稳态，这个新稳态的特点将由这些变量的其它值，即中间物 X 的浓度和通过途径的净通量 J 来表征。因为代谢物 X 的浓度是独特的变量，因此假定它们被均匀地分布在与其发生作用的酶中。亚细胞区室在代谢控制分析中并非是个问题，因为运输过程可被作为具有自己速率的附加的加工步骤归入分析之中。然而，尚不能考虑一个区室中代谢物浓度的空间分布情况，因为这将需要一个复杂的模型来提供代谢物浓度位置的信息。

11.1.1 控制系数和加和定理

代谢控制分析的一个目的是将一个代谢系统的变量同它的参数联系起来。一旦完成这一目的之后，一个系统变量（如通量）对系统参数（即酶活性）的敏感性就能被确定。这些敏感性代表了通量控制的基本方面，因为它们概括了一条代谢途径中由单个酶的活性所施加的系统的通量控制的程度。类似地，能够求解胞内代谢物的浓度而且也能确定其对于酶活性、效应物浓度和其它系统参数的敏感性，这些敏感性可由一组系数概括地描述，其中最重要的是控制系数。它们描述一个参数（例如代谢途径中一个酶的活性）如何影响系统变量（例如通过这条途径的通量）。控制系数仅适用于研究的稳态条件，这就解释了为什么诸如酶活性等途径的“组成零部件”被作为参数来描述，而可随参数的变化而变化的系统性质，如通量和代谢物浓度被作为变量。

最重要的控制系数就是所谓的通量控制系数，常缩写为 FCCs。它的定义为：由代谢途径中一个酶活性的无穷小变化所引起的通量的相对变化与这个酶活性的相对变化之比。值得注意的是：由于酶活性是一个独立的系统参数，因此它的变化将直接影响通量，或通过引起其它系统变量的变化而间接影响通量。式(11.2) 中所用的全导数符号试图表明这一点：在一个稳态通量-酶活性的关系图中（见图 11.1），在某一酶活性处的 FCC 值等于曲线中该酶活性处切线的斜率用相应的稳态通量及酶活性归一化：

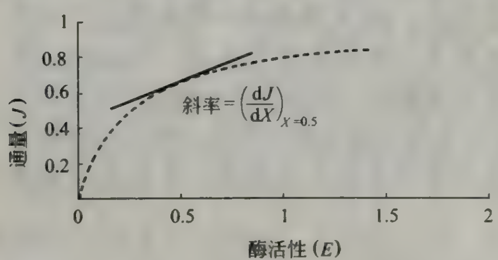


图 11.1 稳态途径通量 J 与途径中一个酶活性的函数关系图

该酶在特定酶活性时的通量控制系数等于该酶活性处切线的斜率乘以酶活性，然后用稳态通量归一化

$$C^J=\frac{E}{J}\times\frac{\mathrm{d}J}{\mathrm{d}E}=\frac{\mathrm{dln}J}{\mathrm{dln}E} \tag{11.2}$$

因为 FCCs 是用相对通量和相对酶活性的形式定义的，所以它们是无因次的。它们的大小与所采用的通量及酶活性单位无关。对于一个线性代谢途径来说，FCCs 的值介于 0 和 1 之间。在分支代谢途径的一般情况下，FCCs 被用来描述每一个酶活性（共 L 个）对通过不同反应的每一通量（共 L 个）的影响：

$$C_i^{J_k}=\frac{E_i}{J_k}\times\frac{\mathrm{d}J_k}{\mathrm{d}E_i}=\frac{\mathrm{dln}J_k}{\mathrm{dln}E_i}\quad i,k\in\{1,2,\cdots,L\} \tag{11.3}$$

---

❶ 在代谢通量分析中（第 8 章），用 v 代表通量。因为 MFA 的一个假定是代谢途径中的中间产物处于稳态（或拟稳态），这就暗示着，通过一条线性代谢途径中的通量等于这条途径中各个单个反应的反应速率（或速率）。而 MCA 的目的是研究参数（即酶活性）对稳态通量的影响，因此要将单个反应的反应速率 v 和总体稳态通量区分开来，所以用 J 表示后者。

式中，J_k 是代谢途径中通过第 k 个反应的稳态通量；E_i 是第 i 个酶的活性。对于这样一个一般系统来说，FCCs 可以是任何值（正值或负值）。

式（11.3）的定义是由 Kacser 和 Burns（1973）给出的原始式。一个更普遍的定义是基于第 i 个反应速率而不是酶活性：

$$C_i^{J_k}=\frac{v_i}{J_k}\times\frac{\mathrm{d}J_k}{\mathrm{d}v_i}=\frac{\mathrm{dln}J_k}{\mathrm{dln}v_i}\quad i,k\in\{1,2,\cdots,L\} \tag{11.4}$$

Heinrich 等（1997）将这个定义表示为：

$$C_i^{J_k}=\frac{v_i}{J_k}\times\frac{\mathrm{d}J_k}{\mathrm{d}p}\left(\frac{\partial v_k}{\partial p}\right)^{-1}\quad i,k\in\{1,2,\cdots,L\} \tag{11.5}$$

式中，p 可以是专门作用于第 i 个反应速率的任何参数。如果酶活性被选为参数 p，倘若反应速率同酶活性成正比（情况经常是这样），则式（11.5）可简化成式（11.3）所示的 FCCs 的原始式。然而，由式（11.4）或式（11.5）给出 FCCs 的一般定义，考虑到对酶-酶相互作用这种特殊情况的处理，如同在代谢物通道开通（Metabolite channeling）的情况，代谢物按顺序被直接从一个酶运输到下一个酶。

从 FCCs 的定义中明显可以看出，具有最大通量控制系数的酶对特定稳态下的通量施加最大的控制，当这个酶的活性增大时，将导致整个通量最大程度的上升。FCCs 归一化后的一个重要结果是：对每一个通量而言，它们的控制系数之和必为 1，这就是通量的加和定理：

$$\sum_{i=1}^{L}C_i^{J_k}=1\quad k\in\{1,2,\cdots,L\} \tag{11.6}$$

该式清楚表明：FCCs 完全取决于系统的结构，关于它们的单个值不能表示一般情况。对于非常长的代谢途径来说，大多数 FCCs 的值比较小，然而，可能仍然存在一个步骤，其对通量施加显著的控制，只要这个步骤的 FCC 值比其它 FCCs 值大得多即可。对于较短的代谢途径来说，即使在通量控制分布于多个步骤的情况下，FCCs 也可能具有更大的值。因此只能在同一代谢途径中对 FCCs 值进行比较，而不能在不同的代谢途径之间进行比较。在长的代谢途径中存在小的通量控制系数解释了为什么为了提高菌株的代谢物产量（如氨基酸和抗生素），需要如此多轮的连续诱变和筛选步骤。

应当注意：对于 FCCs 的名称和概念均存在着异议，这些异议的一些主要背景已由 Fell（1992）评论过，现简单总结如下。

① 在最初的公式中，酶的浓度❶ 被用作描述酶反应速率的参数。然而，考虑到酶活性主要受到同别构酶相结合的效应物作用的影响，因此酶浓度与酶活性及通量控制之间并没有特别的关系。为了纠正这一点，Kacser 和 Burns（1973）引入了另一组控制系数，称为响应系数，用于代谢通量对这些效应物的敏感性的量化：

$$R_{X_i}^{J_k}=\frac{e_i}{J_k}\times\frac{\mathrm{d}J_k}{\mathrm{d}e_i}\quad i,k\in\{1,2,\cdots,L\} \tag{11.7}$$

上述响应系数的定义与 FCCs 的定义类似，实际上可以看作为关于外部效应物的通量控制系数。而且，容易表明［见式（11.12）］，响应系数表示相对于外部效应物的净敏感性，这样

---

❶ 由于酶活仅同酶的活性形式有关，这与诸如通过蛋白质印记法所确定的酶的浓度是非常不同的，因此在此文中，我们喜欢用酶活而不用酶的浓度。这样可以把酶活解释为酶的 $v_{\max}$，而这样做并没有暗示出和胞内酶活力有关的信息，由于异构调节，胞内酶活力可能同它的 $v_{\max}$完全不同。

它们就可以被划分为一个 FCC 部分和一个局部动力学部分（由下面要讨论的弹性来描述）。

② 一个通量对一种酶活性的敏感性并不是该酶是控制酶还是调节酶的度量标准，因此一些人发现控制系数这一术语是令人误解的（Crabtree and Newsholme，1987；Savageau et al，1987a，b；Atkinson，1990）。在许多代谢途径中，对终产物合成速率是通过第一步反应的反馈抑制来调节的，在这种情况下，催化第一步反应的酶是经典意义上的调节酶，但通常它将有一个小的通量控制系数。调节酶具有小的 FCC 值这一明显的自相矛盾在 Kacser 和 Burns（1973）最初的论文中作过专门的讨论。在引入 FCCs 的概念之前，常常意味着一个调节酶是作为限速步骤的一个潜在的候选者，但 FCCs 的引入揭示不一定是这种情况。而且正如在本章的前言中所说的那样，MCA 告诉我们限速步骤这一概念是无意义的，而 FCCs 值可量化速率限制的程度。

③ 由于 FCCs 只适用于稳态研究，随着系统状态的变化，它们也相应发生变化，因此 FCCs 没有多少预测价值，这一点是不容置疑的。但是 MCA 还没被提倡作为像生化系统理论那样的一种用于系统模拟的工具，而只是作为描述代谢控制的一个工具。显然我们希望建立一个能预测酶活性大的扰动如何影响通量的理论，但这是一项非常困难的任务，这是由于细胞反应动力学的非线性特点和胞内酶反应动力学的难以描述的性质。

同 FCCs 类似，可以定义系统参数对胞内代谢物浓度影响的敏感性。这些敏感性被称为浓度控制系数（concentration control coefficients），缩写为 CCCs。其中，受酶活性 E_i 影响的变量是代谢物浓度 C_j：

$$C_i^{X_j} = \frac{E_i}{c_j} \times \frac{\mathrm{d}c_j}{\mathrm{d}E_i} = \frac{\mathrm{dln}c_j}{\mathrm{dln}E_i} \quad i \in \{1,2,\cdots,L\}, j \in \{1,2,\cdots,K\} \tag{11.8}$$

或者，更一般地有：

$$C_i^{X_j} = \frac{v_i}{c_j} \times \frac{\mathrm{d}c_j}{\mathrm{d}v_i} = \frac{\mathrm{dln}c_j}{\mathrm{dln}v_i} \quad i \in \{1,2,\cdots,L\}, j \in \{1,2,\cdots,K\} \tag{11.9}$$

这些系数说明了当第 i 个酶活性变化时，第 j 个中间产物 X_j 浓度水平的相对变化。由于当所有的酶活性同等程度地发生变化时，任何中间代谢物浓度水平保持不变，因此，遵从以下关系：对 K 个代谢物中的每一个来说，其浓度控制系数的总和应为零：

$$\sum_{i=1}^{L} C_i^{X_j} = 0 \quad j \in \{1,2,\cdots,K\} \tag{11.10}$$

式（11.10）显示了对每一个代谢物而言，至少存在一种起负控制作用的酶。也就是说，当该酶活性水平上升时，代谢物浓度却下降了。这样，在式（11.1）所示的简单两步反应途径中浓度控制系数 C_2^X 通常是负值，因为代谢物浓度 c_X 将随着第二个酶活性的上升而下降。

11.1.2 弹性系数和连接定理

MCA 中另一个重要的概念是弹性系数，同描述整个代谢体系系统性质的控制系数有所不同，弹性系数是代谢网络中各个单个酶的局部性质。最常见的弹性系数是反应速率对代谢物浓度的敏感性（或弹性）。正如控制系数的情况一样，弹性系数也相对于反应速率及代谢物浓度而归一化。因此，第 i 个反应速率对于代谢物 X_j 的浓度的弹性被定义为：在假定所有其它系统变量相对于其稳态值保持不变的条件下，由代谢物浓度的无穷小变化所引起的反应速率相对变化之比：

$$\varepsilon_{X_j}^{i} = \frac{c_j}{v_i} \times \frac{\partial v_i}{\partial c_i} = \frac{\partial \ln v_i}{\partial \ln c_j} \quad i \in \{1,2,\cdots,L\}, j \in \{1,2,\cdots,K\} \tag{11.11}$$

因为弹性系数表示对相应的变量求导，因此用了偏导数以表示所有其它变量必须保持恒定。弹性系数可被看作是对于特定代谢物的表观反应速率的级数，因此它们等于生化体系理论（见方框 11.1）中的幂函数的指数。它们具有正值时表明促进一个反应的进行，例如一种底物和一种激活剂；而负值表示减慢了反应的进行，例如一种产物和一种抑制剂。弹性系数在数值上等同于酶对代谢物浓度的响应性这一模糊概念（Fell，1992)。它们也允许对几种底物对反应速率的影响进行定量化（大多数细胞反应有两个或两个以上的底物），产物浓度的影响也是如此，其常有显著作用，这是由于细胞反应的可逆性。

除了对代谢物的弹性之外，弹性系数也可以应用于非代谢中间产物的效应物，即：X_j 可被更广义地解释为影响第 i 个反应速率的任何化合物。根据弹性系数这个广义的定义，可以看出在式（11.7）中导入一种效应物的响应系数是一个受影响的酶的弹性系数和该酶通量控制系数的乘积。

$$R_{X_j}^{J_i} = C_k^{J_i} \varepsilon_{X_j}^k \quad i, k \in \{1,2,\cdots,L\}, j \in \{1,2,\cdots,K\} \tag{11.12}$$

如果一个代谢物或一个效应物作用于一个以上的酶，则总响应系数是每个酶的响应系数之和

$$R_{X_j}^{J_i} = \sum_{k=1}^{L} C_k^{J_i} \varepsilon_{X_j}^k \quad i \in \{1,2,\cdots,L\}, j \in \{1,2,\cdots,K\} \tag{11.13}$$

式（11.12）向我们提供了一个有价值的信息：即使一个酶对一个代谢物或一个效应物的弹性比较大，通量对这种化合物变化的响应也仅仅在其相应的通量控制系数不为零时才是重要的。

对它们的底物或产物的浓度变化高度敏感的酶，也就是说对代谢中间产物具有高的弹性系数的酶，其 FCCs 倾向于低的值（Westerhoff，et al，1984)，这可以用式（11.1）所示的简单两步反应途径来形象地说明如下：第二个酶 E_2 活性的降低（例如由特定抑制剂所引起）将导致其底物 S 和产物 P 的浓度升高。如果 E_2 对 S 和 P 具有大的弹性系数，则上述代谢物浓度的变化将补偿减少着的酶活性。结果，酶活性的降低对总的稳态通量将有很小的影响，这意味着被扰动的酶的通量控制系数值是很小的。类似地，对中间代谢物具有小的弹性系数的酶的扰动会引起显著的通量变化。FCCs 与弹性的关系可由下面的通量-控制连接定理所表达，这是由 Kacser 和 Burns（1973）导出的。

$$\sum_{k=1}^{L} C_i^{J_k} \varepsilon_{X_j}^i = 0 \quad i \in \{1,2,\cdots,L\}, j \in \{1,2,\cdots,K\} \tag{11.14}$$

连接定理通常被认为是 MCA 定理中最重要的，因为它提供了理解局部的酶动力是如何影响通量控制的方法手段。作为进一步的说明，考虑式（11.1）所示简单两步途径。对这个途径，由连接定理给出：

$$C_1^J \varepsilon_X^1 + C_2^J \varepsilon_X^2 = 0 \tag{11.15}$$

或

$$\frac{C_1^J}{C_2^J} = -\frac{\varepsilon_X^2}{\varepsilon_X^1} \tag{11.16}$$

从式（11.16）可以明显看出：大的弹性是和小的 FCCs 相联系的，反之亦然。在接近热力学平衡条件下进行的反应通常对代谢物浓度的变化是非常敏感的，即它们的弹性很大，这也表示这些反应的通量控制通常将很小。

如同 FCCs 的情况一样，也推导出了浓度控制系数的连接定理，虽然它们是少许更复杂

些。当控制系数和弹性涉及不同的代谢物时，连接定理有如下的形式：

$$\sum_{k=1}^{L} C_i^{X_l} \varepsilon_{X_j}^{i} = 0 \quad j,l \in \{1,2,\cdots,K\}, j \neq l \tag{11.17}$$

而涉及相同代谢物时，连接定理的形式为：

$$\sum_{k=1}^{L} C_i^{X_j} \varepsilon_{X_j}^{i} = -1 \quad j \in \{1,2,\cdots,K\} \tag{11.18}$$

通常，很少关注浓度控制系数（CCCs），但正如将在第 13 章中所证明的，当 MCA 结果被用于酶活性扩增的设计时，CCCs 可以给我们提供重要的信息。而且，在 Heinrich 和 Rapoport（1974）的原始推导中，它们被用来推导 FCCs 的表达式［见式（11.24）、式（11.25)］。

相应于代谢物浓度的弹性系数是最常用的，但是 Kacser 等（1990）引入了所谓的参数弹性系数（parameter elasticity coefficients），用它来作为酶对其它参数（例如酶活性或抑制剂，后者不是所研究途径中的代谢物）变化的敏感性的度量标准。对于一个一般的参数 p_j，以下式来定义参数弹性系数：

$$\pi_{p_l}^{i} = \frac{p_l}{v_i} \times \frac{\partial v_i}{\partial p_l} = \frac{\partial \ln(v_i)}{\partial \ln(p_i)} \quad i \in \{1,2,\cdots,L\} \tag{11.19}$$

如果酶活性被选为该参数，则当 i 等于 l 时，参数弹性系数通常等于 1；而当 i 不等于 l 时，参数弹性系数通常等于 0。即第 i 个反应速率和第 i 个酶的活性之间存在着直接的比例关系，而第 i 个酶对途径中的其它反应速率没有影响。当酶活性被作为该参数时，对这些规则一个重要的例外是当酶-酶相互作用的情况。

11.1.3 MCA 理论的一般化

前两节中介绍的概念和定理是 MCA 的基础。在这一节中，它们将被扩展到一般的多反应网络的情况。然而，在此之前，进一步调查通量对酶调节的系统响应是如何能被分成它的源组分（source components）的是很有趣的。这样，酶活性的一个变化将对途径中的通量产生直接的影响，也能通过代谢物浓度的变化对其产生间接影响。随着式（11.19）中参数弹性系数的导入，还存在其它参数对通量可能的影响。因为稳态通量是系统参数（其中一些是酶活性）和代谢物浓度的函数，即 $J_i(p_l, c_j)$，因此 FCCs 可以用下式来定义，它是式（11.3）最初定义的扩展形式：

$$C_i^{J_k} = \frac{E_i}{J_k}\left(\sum_{l} \frac{\partial J_k}{\partial p_l} \times \frac{\mathrm{d}p_l}{\mathrm{d}E_i} + \sum_{j=1}^{K} \frac{\partial J_k}{\partial c_j} \times \frac{\mathrm{d}c_j}{\mathrm{d}E_i}\right) \quad i,k \in \{1,2,\cdots,L\} \tag{11.20}$$

在大多数情况下，这些参数之间并没有耦合，所以一个参数的变化不会改变其它的参数，因此有：

$$\frac{\mathrm{d}p_l}{\mathrm{d}E_i} = \begin{cases} 0; p_l \neq E_i \\ 1; p_l = E_i \end{cases} \tag{11.21}$$

则式（11.20）可以整理为：

$$C_i^{J_k} = \frac{E_i}{J_k} \times \frac{\partial J_k}{\partial E_i} + \sum_{j=1}^{K} \frac{\partial J_k}{\partial c_j} \times \frac{c_j}{J_k} \times \frac{\mathrm{d}c_j}{\mathrm{d}E_i} \times \frac{E_i}{c_j} \quad i,k \in \{1,2,\cdots,L\} \tag{11.22}$$

因为稳态下第 k 个反应的速率（v_k）等于稳态通量 J_k，弹性系数和参数弹性系数的定义表达式可在式（11.22）中被辨认出，此式可重写为：

$$C_i^{J_k} = \pi_i^{j} + \sum_{j=1}^{K} \varepsilon_{X_j}^{k} C_i^{X_j} \quad i,k \in \{1,2,\cdots,L\} \tag{11.23}$$

在大多数情况下，当 i 等于 k 时［即，当第 i 个酶通过它自己的（第 i 个）反应速率来调节通量响应而且反应速率的变化同酶活性的变化成比例时］，参数弹性系数化简为 1；当 i 不等于 k 时（即，当第 i 个酶的活性变化对通过第 k 个反应的通量没有直接影响时），参数弹性系数为零。因此式（11.23）可以进一步简化为：

$$C_i^{J_i} = 1 + \sum_{j=1}^{K} \varepsilon_{X_j}^{i} C_i^{X_j} \quad i \in \{1,2,\cdots,L\} \tag{11.24}$$

$$C_i^{J_k} = \sum_{j=1}^{K} \varepsilon_{X_j}^{k} C_i^{X_j} \quad i,k \in \{1,2,\cdots,L\}, i \neq k \tag{11.25}$$

这些首先由 Heinrich 和 Repoport（1974）在他们最初的论文中导出的方程说明 FCCs 是如何依赖于弹性系数（即单个酶的动力学）和浓度控制系数（即通过代谢物水平上的酶的相互作用）。因此式（11.24）表明当一个酶活性变化时，由酶活性调节所产生的直接影响与由代谢物浓度变化产生的影响结合以产生总通量的变化。这种总通量的变化可以每个代谢物的影响之和来表示，每个代谢物的影响是由该代谢物的浓度变化（CCC）与这种变化对通量的影响（弹性系数）的乘积所给出。式（11.25）显示了第 i 个酶仅通过代谢物浓度变化来影响稳态通量，而这种变化是由其它酶反应的间接影响所引起的。

式（11.22）总共有 L^2 个方程式，利用矩阵符号，可以写成一个更简洁的形式（Ehlde and Zacchi，1997）：

$$\begin{pmatrix} C_1^{J_1} & C_2^{J_1} & \cdots & C_L^{J_1} \\ C_1^{J_2} & C_2^{J_2} & \cdots & C_L^{J_2} \\ \vdots & \vdots & \cdots & \vdots \\ C_1^{J_L} & C_2^{J_L} & \cdots & C_L^{J_L} \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} \pi_{E1}^1 & \pi_{E2}^1 & \cdots & \pi_{EL}^1 \\ \pi_{E1}^2 & \pi_{E2}^2 & \cdots & \pi_{EL}^2 \\ \vdots & \vdots & \cdots & \vdots \\ \pi_{E1}^L & \pi_{E2}^L & \cdots & \pi_{EL}^L \end{pmatrix} + \begin{pmatrix} \varepsilon_{X_1}^1 & \varepsilon_{X_2}^1 & \cdots & \varepsilon_{X_K}^1 \\ \varepsilon_{X_1}^2 & \varepsilon_{X_2}^2 & \cdots & \varepsilon_{X_K}^2 \\ \vdots & \vdots & \cdots & \vdots \\ \varepsilon_{X_1}^L & \varepsilon_{X_2}^L & \cdots & \varepsilon_{X_K}^L \end{pmatrix}$$

$$\times \begin{pmatrix} C_1^{X_1} & C_2^{X_1} & \cdots & C_L^{X_1} \\ C_1^{X_2} & C_2^{X_2} & \cdots & C_L^{X_L} \\ \vdots & \vdots & \cdots & \vdots \\ C_1^{X_K} & C_2^{X_K} & \cdots & C_L^{X_K} \end{pmatrix} \tag{11.26}$$

或

$$\mathbf{C}^{\mathrm{J}} = \mathbf{P} + \mathbf{E} \cdot \mathbf{C}^{\mathrm{X}} \tag{11.27}$$

用在式（11.24）和式（11.25）的推导过程中所应用的假定，参数弹性系数矩阵 **P** 变为一个单位矩阵，即一个所有对角元素为 1 的对角矩阵。式（11.27）是 MCA 的所有定理的一个完整的和通用的公式。它是一个包括了加和定理和连接定理的简洁形式，因此它在后面的分析中，特别在对分支代谢途径的分析中是很有用的。然而，该式的一个缺点是 MCA 的作为例证的定理是含蓄的而且不易辨认。

11.2 通量控制系数的确定

通量控制系数的大小给我们提供了通量增加的相对度量标准，而通量增加是从特定酶活性的扩增所期待的。当然，这并不意味着对于任何酶活性的扩增，通量的增加将同 FCC 成比例。但是，由 FCCs 提供的这种度量是一个合理的近似，尤其是对酶活性小的变化。特别是 FCCs 值接近于 1 的酶反应步骤可以被确定为限速步骤，而且在一个通量扩增计划中应当

被首先强调。另一方面，FCCs 小显示在许多步骤中通量控制的分散，没有哪一步在通量控制中能起决定性的作用。由此可以推断：FCCs 是通量控制的一个重要度量标准，FCCs 的确定在揭示代谢网络通量控制结构的努力中是一个重要里程碑。

为了确定控制系数和弹性系数，已经提出许多实验方法。所有这些方法都包括以这种或那种方式来确定非线性函数的导数，即非线性函数在一些特定点切线的斜率。正如方框 11.2 中所讨论的，这暗示了一个基本问题，由于无穷小的差分只是一种数学抽象，因此确定一个未知函数导数的惟一方法是用一个有限小的差分来去近似它。

方框 11.2　非线性函数的导数

Ehlde（1995）讨论了非线性函数求导过程中的核心问题，它是 MCA 参数实验确定的基础。测量一个未知函数的导数的惟一方法是用一个有限差分来近似它。这要求在目标点的附近进行测量，接着确定经过测量点所画直线的斜率。在该点的导数近似值的准确度随着有限差分长度的增加而减小。同时，如果有限差分不是以目标点为中心，则对目标点处导数的估计会产生偏差。随机误差也将对结果产生影响，当有限近似的尺寸减小时，则对测量误差的敏感性会随之增加。图 11.2 对这些点进行了说明。在这里，希望确定实心圆点处切线的斜率。如果有限差分是基于实心三角处的测量，则该有限差分是小的，可以得到一个对实际斜率的精确估计值。但是这种情况下由于扰动的程度很小，测量误差会很大，因此估计值敏感性也很大。相反地，如果有限差分是基于在实心方块处的测量，则有限差分将比较大，在估测中可能会出现系统误差。但是在这种情况下，估计值对测量误差更不敏感。

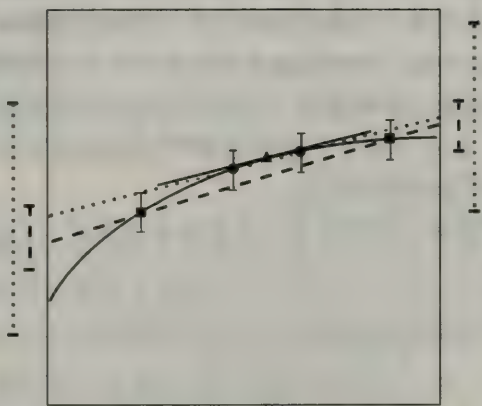


图 11.2　基于有限差分的导数的两种近似方法
数据点的误差线表明了随机测量误差，坐标上的误差线表明了从这两组数据中的每一个数据所得的导数估计值的敏感性

文献中已提出各种方法用于 FCCs 的确定。这些方法可以分为以下三类。

- 直接法。在小的而且有限的酶活性变化之后，直接从通量和酶活性的测量来确定控制系数。
- 间接法。首先确定弹性系数，随后通过 MCA 定理计算得出控制系数。值得注意的是 MCA 理论产生了一个封闭体系，由此，通过这些定理的运用 FCCs 和弹性系数可以互相计算。
- 通过瞬时代谢物浓度的测量来确定 FCCs。

还有第四种方法也已提出，它是利用大范围酶活性扰动所产生的通量和酶活性测量。由于此法简单实用，具有重要的应用前景，将在 11.5 节中对其进行更为详细的检验。

最近已经在进行这样的争论：除非首先用双曲线回归分析对实验数据进行处理，并且实际的通量对酶活性的曲线图必须密切符合图 11.1 所示双曲线图，否则没有任何实验方法可以给出满意的结果（Pettersson，1996）。这种争论暗示，如果上述条件不满足，MCA 应该以能够直接计算 FCCs、CCCs 和弹性系数的动力学模型为基础。虽然对利用动力学模型来确定 FCCs 值的精确性毫无争议，但仍要注意的是，这种方法被模型的有效性和模型证实所严格限制。因此，FCC 确定的实验方法步骤是很有用的，应该花更多的精力来对其进行完

善。此外，一个给定代谢途径的通量控制分析的结果不应该打算作为一种最终的回答，而仅仅可作为途径中的通量控制是如何分布的一种表示。

11.2.1 确定通量控制系数的直接法

确定 FCCs 的最直接的方法是在保持所有其它代谢参数不变时，观察一条代谢途径中酶活性操纵对通量的影响结果。根据与从酶的有限变化进行导数确定相联系的根本问题（见方框 11.3），应该做足够多的实验来首先确立酶活性和通量之间的基本关系，即得到一个类似于图 11.1 的关系图。一旦这样的图可以利用，就可从图中相应酶活性对应的曲线切线的斜率来确定 FCCs。这导致 FCCs 的一种非常精确的确定。它的主要缺点是需要大量的实验来建立通量-酶活性关系曲线。

所表达的酶活性的遗传变更

随着分子生物技术的快速发展，改变酶活性的最直接的方法是通过在基因水平控制表达。这种方法使我们可以研究细胞内酶活性改变的效果。但是实际的酶活性变化会产生大的扰动，这可能不适合于用无穷小的分析方法来确定斜率。在 11.5 节的大扰动法更适合于利用这种方法的结果。或者，需要做大量的实验以得到一个类似于前面讨论的如图 11.1 所示的曲线图来解决这个问题。

利用遗传手段来改变酶活性，这可以通过改变目的酶的基因剂量或插入一个调节型启动子来随意操纵基因的表达来实现。可以通过选育不同等位基因的纯合子和杂合子的经典方法来改变基因剂量，Flint 等（1981）对这种方法作了说明，他们研究了丝状真菌粗糙脉孢菌（*Neurospora crassa*）的精氨酸生物合成途径。除了改变有效基因的剂量之外，这种方法也能通过利用不同比活性的多态等位基因使催化活性得到改变。但经典法的缺点是不能对酶活性进行精细的调节，此外，需要构建许多不同突变株的遗传工程，其工作量是很大的。

一个更具有目的性的提高基因剂量的方法是导入带有目的基因的多拷贝质粒或将多个基因整合在染色体上。这种方法不能提供减少基因剂量的适应性，但是对多倍体菌株来说，有可能对酶活性进行下调，这可以通过构建缺少目的基因的缺失突变株（或者导入点缺失而破坏编码目的酶的基因）来实现，缺失可以发生在一条或多条染色体上。Niederberger 等（1992）对这种方法作了说明，他们研究了酿酒酵母的四倍体菌株中色氨酸生物合成途径。这条途径中的五个酶的活性可以通过改变其基因剂量来进行下调，通过这条途径的代谢通量并没有被直接确定，但是研究了这些酶活性对该酵母比生长速率的影响，并确定了相应的 FCCs。所有的 FCCs 都很小❶，并由下调实验所验证，酶活性的增加（通过多拷贝质粒获得）对通量只有很小的影响。在充分表达了的菌种中，例如在 *S. cerevisiae*（其整个基因组已经测序）和 *E. coli*（其缺失突变株通常可以获得或容易构建）中，对酶活性的下调相对来说是比较容易的，但对于性质了解得比较少的菌种就比较困难了，在这种情况下要把大量的工作用在构建所必须的突变株上。

用基因工程调节酶活性的极好的方法是在所研究的途径中编码目标酶的基因前插入调节型启动子，例如大肠杆菌中的 *tac* 启动子（由 *lac* 启动子和 *trp* 启动子杂交而成）。这种方法具有双重益处：既可以调节酶活性的大小，又能实现酶活性的上调节或下调节。Ruyter

---

❶ 十分明显，当通过诸如测定比生长速率的方法来测定通过色氨酸合成途径的通量时，得到了小的 FCCs 值，它实际上表示单个酶对整个生物质合成总通量的影响。事实上作者吃惊地发现，FCCs 值介于 0.05～0.17 的量级，正如所期望的那样，生物质合成通量的控制分布于整个生物合成途径的大量酶中。

等（1991）介绍了调节型启动子的应用，他们研究了酶Ⅱ^{Glc}（在葡萄糖-PTS中的一个蛋白，见2.2.3节）的基因控制（通过 *tac* 启动子）及其对 *E. coli* 中葡萄糖代谢的影响。质粒中含有编码 lac^{Iq}阻遏物的基因，因此允许通过变动培养基中的诱导物异丙基硫代-β-D-半乳糖苷（IPTG）的量来控制 *tac* 启动子的表达效率。将该质粒导入了在染色体上不含编码Ⅱ^{Glc}基因的菌株中，因此就有可能在20%～600%（同野生型中的酶活性比较）的范围内来改变该蛋白的活性。从该研究中得出结论：在葡萄糖限制的培养基中，PTS蛋白对比生长速率或葡萄糖氧化速率没有（或仅有很小的）影响。然而却发现Ⅱ^{Glc}对葡萄糖的类似物甲基-α-吡喃半乳糖苷（其FCC值约为0.6）的吸收和磷酸化施加重要的控制。

方框 11.3　式（11.39）的推导

Delgadoh 和 Liao（1991）在他们的原始论文中推导出了式（11.39），他们假定关于代谢物浓度的动力学是线性的：

$$v_i = \sum_{j=1}^{K} k_{ij}c_j + b_i \quad i \in \{1,2,\cdots,L\} \tag{1}$$

式中，k_{ij}是动力学常数，并且由于反应速率的线性化 b_i 也是常数。从弹性系数的定义中可以写出：

$$\varepsilon_{X_j}^{i} = \frac{c_j}{J_i}k_{ij} \quad i \in \{1,2,\cdots,L\}, j \in \{1,2,\cdots,K\} \tag{2}$$

其中 J_i 是通过第 i 个反应的稳态通量。将式（2）代入连接定理表达式可推导出

$$\sum_{i=1}^{L} C_i^{J_k} k_{ij} \frac{c_j}{J_i} = 0 \quad i \in \{1,2,\cdots,L\}, j \in \{1,2,\cdots,K\} \tag{3}$$

或

$$\sum_{i=1}^{L} C_i^{J_k} \frac{k_{ij}}{J_i} = 0 \quad i \in \{1,2,\cdots,L\}, j \in \{1,2,\cdots,K\} \tag{4}$$

因为 $c_j \neq 0$。乘以 Δc_j 后，对所有代谢物进行加和则有：

$$\sum_{j=1}^{K}\sum_{i=1}^{L} C_i^{J_k} \frac{k_{ij}}{J_i}\Delta c_j = 0 \quad k \in \{1,2,\cdots,L\} \tag{5}$$

由上式推导出：

$$\sum_{i=1}^{L} C_i^{J_k} \frac{\Delta v_i}{J_i} = 0 \quad k \in \{1,2,\cdots,L\} \tag{6}$$

因为 $\Delta v_i = v_i(t) - J_i$，它是瞬时反应速率与稳态通量的差，因此式（11.39）很容易用加和定理导出。

纯化酶的滴定法

无细胞抽提物可用纯化酶来滴定，而且如果酶活性被作为一个参数来测定，则通量控制系数可被直接确定。这种方法的缺点是实验结果对实验误差的敏感性很大，特别是当FCCs比较小时。Torres等（1986，1991）提出了一种减小对实验误差的敏感性的程序，这种程序是基于途径缩短，由此，途径中所有的其它酶（所谓的附属酶）都被过量供给以减小它们对通量控制的贡献。在这些条件下，通量控制分布在所研究的酶中，在这些酶之间通量控制的相对分布可用酶滴定法来量化，由此确定的体外FCCs与体内的FCCs成比例，但前者稍大。这种方法的一个重要假定是所有的反馈和前馈调节回路都被限定在所研究的途径区段

内，并且酶的饱和度在滴定过程中不会发生变化。Torres 等（1986）曾用滴定法来研究鼠肝脏细胞抽提物中糖酵解途径的催化前几步反应的酶。醛缩酶、磷酸丙糖异构酶和 3-磷酸甘油脱氢酶被过量添加，用己糖激酶（HK）、6-磷酸葡萄糖异构酶（GPI）和磷酸果糖激酶(PFK）来进行滴定。从他们的滴定分析中发现：实际上，GPI 对糖酵解途径的通量没有控制作用［这同磷酸己糖构成了一个单独的代谢库这一普遍发现相一致（见 2.3.1）］。而 HK 和 PFK 的通量控制系数被确定为分别是 0.77 和 0.24（注意这满足加和定理）。滴定程序非常好，但是很明显它只能应用于纯化酶可利用的系统中。此外，需要将目的途径部分与代谢的其余部分进行解耦，这就加入了一个限制，特别是对那些调节回路尚未识别的系统。

特异性抑制剂滴定法

对许多酶来说，存在特异性抑制剂，其可用来滴定体内酶活性，当产生的通量被测之后，就能得到相对于抑制剂的响应系数［见式（11.7)］的估计值。如果酶相对于抑制剂的响应（即弹性）已知，就可以通过式（11.12）算出通量控制系数。因为所要确定的 FCCs 是对于不存在抑制剂的情况，因此，必须对抑制剂浓度为零的情况下的响应系数进行计算：

$$\frac{c_{\mathrm{I}}}{J} \times \frac{\mathrm{d}J}{\mathrm{d}c_{\mathrm{I}}}\bigg|_{c_{\mathrm{I}}=0} = R_{\mathrm{I}}^{J} = C_i^J \varepsilon_{\mathrm{I}}^{i} = C_i^J \frac{c_{\mathrm{I}}}{v_i} \times \frac{\partial v_i}{\partial c_{\mathrm{I}}}\bigg|_{c_{\mathrm{I}}=0} \tag{11.28}$$

或

$$C_i^J = \frac{1}{J} \times \frac{\mathrm{d}J}{\mathrm{d}c_{\mathrm{I}}}\bigg|_{c_{\mathrm{I}}=0} \left(\frac{1}{v_i} \times \frac{\partial v_i}{\partial c_{\mathrm{I}}}\bigg|_{c_{\mathrm{I}}=0}\right)^{-1} \tag{11.29}$$

对于不可逆抑制剂，酶活性随抑制剂浓度线性减小。在此情况下，式（11.29）括号中的数值等于酶活性完全控制时的抑制浓度的负值（$-c_{\mathrm{I,\,max}}$），因此可由下式得出 FCCs 值 (Groen，et al，1982)：

$$C_i^J = -\frac{c_{\mathrm{I,max}}}{J} \times \frac{\mathrm{d}J}{\mathrm{d}c_{\mathrm{I}}}\bigg|_{c_{\mathrm{I}}=0} \tag{11.30}$$

式（11.30）的最后一项可从抑制曲线在起始点处切线的斜率求出，对于可逆竞争性抑制剂和非竞争性抑制剂，其它的表达式成立（Groen，et al，1982)，但是如果抑制剂对反应速率的影响已知，则很容易算出式（11.29）中的最后一项。

抑制剂滴定也许是确定 FCCs 最广泛应用的方法，特别是在对分离到的线粒体和细胞中的呼吸的研究中。在对鼠肝脏线粒体的研究中，Groen 等（1982）用特异性抑制剂确定了以琥珀酸为底物的氧化磷酸化途径中各个单一步骤的 FCCs，结果如表 11.1 所示。Fell (1992）叙述了抑制剂滴定法确定 FCCs 的许多其它应用。其中，要提及 Walter 等（1987）对巴氏梭状杆菌（*Clostridium pasteurianum*）中葡萄糖 PTS 系统在糖酵解途径调节中的作用的一项研究。在此项研究中，木糖醇被用作葡萄糖 PTS 的特异性抑制剂，研究结果发现在糖酵解通量中运输系统的 FCC 等于 0.14。

抑制剂滴定法的一个主要问题是：通量-抑制剂曲线初始斜率必须外推至 c_{I} 为零以确定式（11.30）的最后一项。由于抑制剂对通量的影响通常是高度非线性的，这就引起方框 11.3 中所讨论的问题。把一条线拟合成曲线的准线性初始部分是不可靠的，而拟合成非线性函数，如多项式函数，确实使估计值得到一些改进（Small，1993)。这种方法的另一限制是抑制剂必须是非常特异的，它对系统的其它反应绝对没有影响。

表 11.1 鼠肝脏线粒体的氧化磷酸化途径中，不同步骤的通量控制系数

酶	步 骤	抑 制 剂	FCC
腺嘌呤核苷转运蛋白	将 ATP 从线粒体运输到细胞质	胶苍术苷	0.29±0.05
质子泄漏①	质子梯度的泄露	质子解耦剂	0.04±0.01
二羧酸盐运输蛋白	将琥珀酸盐运入细胞质	苯基琥珀酸盐	0.33±0.04
细胞色素 C 氧化酶	将电子传递给氧	叠氮化物	0.17±0.01
bc_1 复合体	琥珀酸盐脱氢酶	氢醌-N-氧化物	0.03±0.005
己糖激酶②	ATP 消耗	—	0

① 在质子泄漏的 FCC 值的估算过程中，添加了不同量的寡霉素和一种质子解耦联剂[乙二醇双(β-氨基乙醚)-N, N, N', N'-四乙酸]来切断氧化磷酸化作用。这个过程暗中假定了当没有 ADP 再生时，质子泄漏的 FCC 值为 1，这一假定受到 Brand 等（1988）（见例 12.3）的否定。数据来自 Groen 等（1982b）。

② 己糖激酶的 FCC 值通过酶滴定法来测定。

11.2.2 确定通量控制系数的间接法

本节所描述的方法之所以被称为间接法是因为首先通过实验确定了弹性，然后利用 MCA 定理确定出 FCCs。构成这种方法的基础有两个主要的假定：（1）该代谢系统是充分描述的，即所有反应和有关的调节相互作用都已包括在系统描述中；（2）系统处于稳态，初始底物和最后产物的浓度是定值。为了确保这些条件得到满足，最好至少直接确定系统的一个控制系数来对结果进行检验。Groen 等（1986）在他们对鼠肝脏细胞的糖异生途径的研究中，确定了所有的弹性系数（见例 11.2），并用了 MCA 定理计算这条途径中的 FCCs。为了检验该结果，他们也确定了途径对应于底物丙酮酸的响应系数。由于也测定了第一步反应（丙酮酸脱羧）对应于丙酮酸的弹性，所以第一步的 FCC 可通过响应系数的定义来计算［式（11.12)］。

许多不同方法可被用来确定弹性系数。下面是对最常用方法的简述。

双调节法（Double Modulation）

为了对这种方法进行说明，考虑 EMP 途径中的己糖异构酶反应：

$$\cdots\rightarrow \underset{\text{(6-磷酸葡萄糖)}}{\text{glucose-6-phosphate}} \xrightarrow{\text{GPI}} \underset{\text{(6-磷酸果糖)}}{\text{fructose-6-phosphate}} \rightarrow\cdots \tag{11.31}$$

该异构酶反应的速率仅依赖于所示的化合物的浓度，即 $v_{\mathrm{GPI}}=f(c_{\mathrm{G6P}},\ c_{\mathrm{F6P}})$。在稳态下，该反应速率等于通过 EMP 途径的通量 J，因此有：

$$\mathrm{d}J=\frac{\partial v_{\mathrm{GPI}}}{\partial c_{\mathrm{G6P}}}\mathrm{d}c_{\mathrm{G6P}}+\frac{\partial v_{\mathrm{F6P}}}{\partial c_{\mathrm{F6P}}}\mathrm{d}c_{\mathrm{F6P}} \tag{11.32}$$

用稳态通量 J 对该式进行衡量并对结果进行整理后可得：

$$\mathrm{dln}J=\varepsilon_{\mathrm{G6P}}^{\mathrm{GPI}}\mathrm{dln}c_{\mathrm{G6P}}+\varepsilon_{\mathrm{F6P}}^{\mathrm{GPI}}\mathrm{dln}c_{\mathrm{F6P}} \tag{11.33}$$

在一个控制实验中，测定两个代谢物的浓度和稳态通量是可能的。通过引入一个扰动，例如改变细胞外葡萄糖的浓度，以产生一组新的通量和代谢物浓度的稳态测量值❶。通过用差分来对式（11.33）中的微分进行近似，这个扰动实验就产生一个方程，此方程将通量和浓度的测量同两个弹性系数联系起来。如果引入第二个扰动，则另一组稳态通量和代谢物浓度的数据可以产生第二个方程，从而可由此计算出两个弹性系数。

这个被称为双调节的方法是由 Kacser 和 Burns（1979）首先提出的。很显然，必须恰

❶ 十分明显，恒化培养实验对这种类型的研究是非常合适的，因为对每一种细胞外的葡萄糖浓度都能达到稳态，此外，通过 EMP 途径的通量能在恒化培养中被精确估计，并且可以取得足够大的样品以获得胞内代谢物浓度的完整数据。

当地设计两个扰动实验以产生两个线性无关的方程，即下面的不等式必须得到满足：

$$\frac{\mathrm{dln}c_{\mathrm{G6P}}^{1}}{\mathrm{dln}c_{\mathrm{F6P}}^{1}} \neq \frac{\mathrm{dln}c_{\mathrm{G6P}}^{2}}{\mathrm{dln}c_{\mathrm{F6P}}^{2}} \tag{11.34}$$

式（11.34）中的上标与相应的扰动得到的测量相对应。如果式（11.34）两边之间的差别很小，则表明产生的两个方程对弹性的计算是病态的，方程的解对实验误差会变得非常敏感。实际上，在很多途径中很难得到一组线性无关的测量值来满足式（11.34）。为了提高这些测量真正相互独立的概率，Fell（1992）建议调节既要在所研究途径的上游进行，又要在下游进行。这种方法的另一个缺点是为了满意地用有限差分来近似微分而需要尽可能小的变化，但这种变化很可能被与之不成比例的实验误差所支配。值得注意的是，对于大多数酶反应来说，除了反应物和产物之外还存在诸如辅因子和抑制剂等其它效应物。这意味着反应速率是多于前面例题所用的两个变量的函数。由于需要用一个不同弹性来描述每一个变量的作用，因此有必要进行两次以上的扰动实验来产生线性无关的方程。

单调节法（Single Modulation）

对于一个像式（11.31）所示那样的反应序列，如果知道其中一个弹性系数，则其它的弹性系数可通过单调节实验获得。这种方法的优点是可以应用几个同类型的但调节幅度不同的调节，并且可用作图法来确定方程式（11.33）中的微分项。Greon 等（1986）用此法确定了丙酮酸激酶对磷酸烯醇丙酮酸的弹性系数和丙酮酸羧化酶对细胞质中草酰乙酸的弹性系数（见例 11.2）。此法显然比双调法的稳定性更强健，但它仍依靠方程式（11.33）中的微分项有一个精确的估计，当然还需要一个弹性系数的信息。

自上而下法（Top-Down Approach）

在许多情况下，由所有的 FCCs 所提供的详细信息对我们来说并不真是必需的，而识别出大部分通量控制所在的一组（Group）却更为重要。这可帮我们将注意力集中在代谢的重要部分。而且，重复此过程可以使我们将通量控制定位于逐渐更小的反应组中。反应分组在代谢途径通量控制分析中是一个很有用的概念，对此将在第 13 章中详细讨论。其基本想法出自由 Brand 、Brown 及其同事们对 MCA 引入的自上而下法，由此将所研究的代谢途径分为只有一个共同的代谢物的几个部分（或几个组）（Brown et al，1990a；Hafner et al，1990）：

$$\mathrm{S} \xrightarrow{\mathrm{Group1}} \mathrm{X} \xrightarrow{\mathrm{Group2}} \mathrm{P} \tag{11.35}$$

在分支途径中，共同的中间产物 X 显然是分支点处的代谢物，而对于一个线性代谢途径，X 将是 K 个代谢物中的一个。可以引入组通量控制系数以提供一种度量标准，用于度量该组中的反应所施加的通量控制程度。很容易看出式（11.35）的两个反应组中的每一个的 FCCs 等于该组中各步反应的 FCCs 之和（Brown et al，1990a），而组 FCCs 服从加和定理：

$$C_{\mathrm{Group1}}^{J} + C_{\mathrm{Group2}}^{J} = 1 \tag{11.36}$$

除了 FCCs 之外，可引入一组关于中间代谢物的弹性系数来描述那个代谢物对该组中反应速率的影响（见第 13 章）。

$$\varepsilon_{\mathrm{X}}^{\mathrm{Group}i} = \frac{c_{\mathrm{X}}}{v_{\mathrm{Group}i}} \times \frac{\partial v_{\mathrm{Group}i}}{\partial c_{\mathrm{X}}} \quad i \in \{1,2\} \tag{11.37}$$

类似于连接定理，组弹性系数和组通量控制系数有以下关系：

$$C_{\mathrm{Group1}}^{J} \varepsilon_{\mathrm{X}}^{\mathrm{Group1}} + C_{\mathrm{Group2}}^{J} \varepsilon_{\mathrm{X}}^{\mathrm{Group2}} = 0 \tag{11.38}$$

对于组浓度控制系数，类似的定理也成立（Brown et al，1990a）。

当代谢途径被分割之后，总弹性系数可以被确定，例如，通过双调节法实验，或如果弹性系数之一已知，可通过单调节法确定其它弹性系数。从式（11.36）和式（11.38）中，可以算出组 FCCs，以提供存在于两部分代谢途径中的每一个部分通量控制的度量标准。原则上，由于可在任意位置对途径进行分割，这就将有可能渐渐缩小具有最大组 FCC 的一组单个反应。然而，应用双调节法或单调节法的一个前提是除了代谢中间产物 X 外没有任何其它的效应物，也就是说，反应组之间除了通过中间产物 X 之外，相互之间不能发生任何对话（cross-talk）。这也是这种方法的一个主要缺点，因为在许多情况下，除了通过共同的中间产物 X 外，两个组之间的相互作用经常发生。在第 13 章中介绍了一种方法，用于对这种相互作用的强度及其影响从通量测量进行 FCCs 确定的程度的评估。自上而下法被 Brand，Brown 及其同事们用来分析氧化磷酸化作用（见例 11.3），并且它在复杂反应网络的分析中也很有用，在第 13 章中将对此作详细的介绍。

从动力学模型计算弹性系数

如果一个有效的数学模型可用于表达一个酶反应的速率，则它对效应物和底物的弹性很容易用弹性系数的定义来计算。为了控制分析的目的，并不需要动力学方程是基于机理而得出的，只要它正确地描述不同效应物的动力学影响即可。这种方法简单直接，而且非常强健，但它引起了一个基本的问题：体外酶动力学是否正确描述了体内酶的功能？幸运的是，v_{max}值在弹性系数的计算中被消除了，这样问题就简化成为对亲和性（或 K_m 值）的计算。在这些研究中考虑到所有可能的效应物也是很重要的。此外，因为小弹性系数值通常与大的控制系数有联系，因此具有小的弹性系数的效应物对通量控制是最重要的，而在大多数酶动力学的体外研究中存在着集中到具有大弹性系数的效应物上的趋势。在用体外酶动力学的数据的另一个告诫是，大多数酶动力学研究是基于初始反应速率的测量，此时没有反应产物存在。显然这种实验情景是代表不了体内条件的。

有许多通过动力学模型来计算弹性系数的例子。在 Groen 等（1986）对鼠肝脏细胞中糖异生作用的分析中用此法确定了一些弹性系数（见例 11.2）。Galazzo 和 Bailey（1990）在对 *S. cerevisiae* 中糖酵解途径的分析中计算了所有关键步骤的组弹性系数，并用它们分别计算出悬浮细胞和固定化细胞培养中从葡萄糖到乙醇途径的 FCCs。这个主题将在第 12 章、第 13 章中进行详述。

11.2.3 瞬态代谢物测量的应用

即使 FCCs 是对稳态系统定义的，Delgado 和 Liao（1992a，b）提出了通过直接测定代谢物的瞬态浓度来确定 FCCs 的方法，该方法提出四个假定。

（1）外部代谢物库对代谢途径的动力学没有影响，或它们的浓度被控制在一个稳态水平。这也是 MCA 一个普遍假定。

（2）在稳态点附近酶动力学的线性近似在一个较宽的代谢物浓度范围内是有效的。此限制条件在随后的讨论中可以被放宽。

（3）从代谢物浓度的测量来确定通过途径中每一反应的瞬时通量在理论上一定是可行的。

（4）代谢物在体系中均匀分布（MCA 的另一个普遍假定）。

基于上述假定，可以推导 FCCs 与通过每个酶的瞬时通量之间的如下关系（见方框 11.3）：

$$\sum_{i=1}^{L} C_i^J \left[\frac{v_i(t)}{J_i}\right] = 1 \tag{11.39}$$

式中，$v_i(t)$ 是通过第 i 个反应的瞬时通量，J_i 是稳态通量。瞬时通量可由代谢物浓度的测量估算出，式（11.39）可用来计算途径的 FCCs。然而，从代谢物测量浓度来精确估计瞬时通量（包括导数的确定）是一个很难进行并容易出错的过程。由于这个原因，Delgado 和 Liao（1992a）提出了另一种可供选择的方法，此法基于式（11.39）的积分形式。按照此法，可通过利用式（11.40）从瞬态代谢物测量首先确定一组系数 α_j，式（11.40）等价于式（11.39）的积分形式：

$$\sum_{j=1}^{K} \alpha_j [c_j(t) - c_j(0)] = t \tag{11.40}$$

对该途径中的 FCCs 与式（11.40）的系数 α_j 进行关联。对于一个线性途径，这个关系如下所示：

$$(C_1^J, C_2^J, \cdots, C_L^J) = (\alpha_1, \alpha_2, \cdots, \alpha_K)\mathbf{G}^* J \tag{11.41}$$

式中，J 是流经途径的稳态通量；$\mathbf{G}^*$ 是途径的化学计量矩阵。式（11.41）中的化学计量矩阵与第 3 章中介绍的关于胞内代谢物的化学计量矩阵 $\mathbf{G}$ 不完全一样，因为其需要被扩充到包括途径中底物和代谢产物的化学计量系数（分别置于矩阵中的第一列和最后一列中）。对于一个分支途径，等价于式（11.41）的 FCC 计算式为：

$$\mathrm{C}^{\mathrm{J}} = (\alpha_1, \alpha_2, \cdots, \alpha_K)\mathbf{G}^* \mathrm{J} \tag{11.42}$$

式中，C^{J} 是包含所有 FCCs 的矩阵［见式（11.26）］；J 是在对角线上含有通过途径的各个单个分支的通量的对角矩阵。

在对一个稳态恒化器注入一个脉冲之后所产生的瞬态期间内代谢物浓度测量值用式（11.40）进行回归拟合，就可确定系数 α_j 的值。然后可以利用这些系数从式（11.41）或式（11.42）来计算 FCCs。如果在代谢物浓度之间存在线性约束，也就是说，一个代谢物浓度是其它代谢物浓度的线性组合时，则对式（11.40）的最小平方拟合是不可能的。这种约束的一个例子是质量平衡方程：

$$\sum_{i=1}^{K+2} [c_i(t) - c_i(0)] = 0 \tag{11.43}$$

对于诸如 NAD^+ 和 NADH❶ 等作为被保存一半的化合物也可能存在化学计量上的约束限制。即使在式（11.40）中可能已经滤掉了这些限制，但通过删除该代谢物浓度的测量值及其在化学计量矩阵中的相应行来消除这些限制是明智的。最好的选择是删除那些具有最大不确定性的测量值。

即使没有化学计量学上的限制，由于动力学的原因，一些代谢物之间可能仍然是线性相关的。例如，如果一个反应的反应速率大大快于其它的反应，这个反应在发生扰动之后可以很快达到准平衡状态，结果其底物和产物的浓度将与平衡常数相关联。Delgado 和 Liao（1992a）建议：如果事先知道这些平衡反应，应将这些受平衡反应约束的代谢物一起归并进一个共同代谢库中。

---

❶ 要注意到：在对胞内代谢物的化学计量矩阵 G 的定义中仅仅包括了一个代表了所有的作为储存部分的化合物的化学计量系数，例如：包括一个仅代表化合物 NAD^+ 或 NADH 的化学计量系数。这样在化学计量矩阵 G 中不存在线性相关的代谢物，因此在对矩阵的定义中不存在化学计量上的限制。

基于瞬时代谢物测量的方法也可以用来确定 CCCs（Delgado 和 Liao，1992b）。这里的分析类似于式（11.39）的一个方程式：

$$\sum_{i=1}^{L} C_i^{X_j}\left[\frac{v_i(t)}{J_i}\right] = 1 - \frac{c_j(t)}{c_{j,ss}} \tag{11.44}$$

式中，$c_{j,ss}$是稳态代谢物浓度。式（11.39）和式（11.44）清楚地表明：代谢物浓度和通过各个单个反应的通量不能随着对一个稳态的扰动而独立地发生变化，这是由于它们被在稳态时的控制系数所限制。式（11.44）的积分形式可以用来确定浓度控制系数，这允许对代谢物测量值进行线性函数的最小二乘回归，接着就可以计算 CCCs 了。

这种瞬时代谢物测定的方法非常好，因它能使控制系数的确定相对比较容易。这种方法的主要批评性意见是线性化的动力学假定。但是最近的研究（Nielsen，1997）表明，当反应动力学能用相对于代谢物浓度的对数的线性函数描述时，这种方法也可应用。这类线性化通常可以对反应动力学进行更精确的描述。目前还没有用此方法对一个完整代谢途径进行分析的实际例证。Delgado 等（1993）用这种方法确定了一个体外重建的部分糖酵解途径中己糖激酶和磷酸果糖激酶的 FCCs，同时也用酶滴定法确定了 FCCs，发现两种方法所得的结果非常一致。该方法中的另一个问题是所确定的控制系数对测量误差有很高的敏感性(Ehlde 和 Zacchi，1996)，这是各个代谢物浓度之间存在高度相关性的结果。基于该方法的理论分析（用 Monte Carlo 模拟法），Ehlde 和 Zacchi（1996）得出结论：不可能从实际的实验数据得到控制系数的合理确定，因为这样的数据总是由于带有某种噪声而变坏。

11.2.4 动力学模型

当对所研究的代谢途径建立了完整的动力学模型之后，原则上 MCA 的概念就不需要了。如果这种生化模型是足够强健的，它可用来预测酶活性的小的扰动和大的变化两种情况的影响。此外，生化模型的结构通常将揭示代谢物和效应物水平对反应速率的影响。尽管这种事实，应用动力学模型来确定不同条件下的 MCA 系数仍是很有价值的，因为它们提供了关于通量控制的简明定量的信息。对于动力学模型在完整代谢途径中的应用的一个总评判是：尽管包含了细节的程度，但它们不能包括系统中所有可能的相互作用，因此它们只代表系统的一种模型，特别是当动力学模型被用于预测时，其强健性（robustness）是极端重要的。但不幸的是，大多数生化模型，即使是非常详细的模型，也只是在接近对参数进行估计的操作条件下才有效，也就是说，它们的预测力是有限的。然而，对于复杂系统的分析来说，模型对所有变量给出定量正确的描述是不必要的，因为有些模型甚至只对系统中最重要的相互作用给出定量正确的描述，但其在通量控制研究中可能非常有用。

11.3 线性途径的 MCA

在本节和下一节中，将把代谢控制分析运用到线性和分支代谢途径中。MCA 方程的特殊形式就是在这些情况下推导出来的，它们的应用将用作为例证的实例来说明。

对一个线性代谢途径来说，代谢物的个数是 $L-1$，L 是酶反应数，也就是说，代谢物数比酶反应数少 1。在这种情况下只有一个通量，它等于稳态下所有反应的反应速率。同时还存在 L 个未知通量控制系数，每一个系数表示代谢途径中每一反应对整个代谢途径通量的影响。FCCs 可以通过连接定理和加和定理共同来确定。对于 $L-1$ 个中间代谢物有 $L-1$ 个连接定理，与加和定理一起，就提供了恰好足够多的方程以从弹性系数计算出 L 个通量控制系数。类似地，浓度控制系数也能从相应的连接定理和加和定理来确定。对于（通量和

浓度）控制系数方程（总共 L^2 个方程）能以矩阵形式方便地概括为下式，这是由 Fell 和 Sauro（1985）提出的。

$$\begin{pmatrix} 1 & 1 & \cdots & 1 \\ \varepsilon_{X_1}^1 & \varepsilon_{X_1}^2 & \cdots & \varepsilon_{X_1}^L \\ \cdot & \cdot & \cdots & \cdot \\ \varepsilon_{X_K}^1 & \varepsilon_{X_K}^2 & \cdots & \varepsilon_{X_K}^L \end{pmatrix} \begin{pmatrix} C_1^J & -C_1^{X_1} & \cdots & -C_1^{X_{L-1}} \\ C_2^J & -C_2^{X_1} & \cdots & -C_2^{X_{L-1}} \\ \cdot & \cdot & \cdots & \cdot \\ C_L^J & -C_L^{X_1} & \cdots & -C_L^{X_{L-1}} \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} 1 & 0 & \cdots & 0 \\ 0 & 1 & \cdots & 0 \\ \cdot & \cdot & \cdots & \cdot \\ 0 & 0 & \cdots & 1 \end{pmatrix} \quad (11.45)$$

容易表明该式完全等同于式（11.26）对线性途径的一般化形式。其中参数弹性矩阵 **P** 等于单位矩阵。如果弹性系数矩阵是非奇异的，则可以通过矩阵求逆来计算控制系数。以这种方法，由控制系数所表示的系统性质与在弹性系数中所反映的局部酶动力学就被联系起来。

为说明这些概念，我们回到式（11.1）所示的简单二步途径，为此，式（11.45）简化为下式：

$$\begin{pmatrix} 1 & 1 \\ \varepsilon_X^1 & \varepsilon_X^2 \end{pmatrix} \begin{pmatrix} C_1^J & -C_1^X \\ C_2^J & -C_2^X \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} 1 & 0 \\ 0 & 1 \end{pmatrix} \quad (11.46)$$

其解为❶：

$$\begin{pmatrix} C_1^J & C_1^X \\ C_2^J & C_2^X \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} \dfrac{\varepsilon_X^2}{\varepsilon_X^2 - \varepsilon_X^1} & \dfrac{1}{\varepsilon_X^2 - \varepsilon_X^1} \\ \dfrac{\varepsilon_X^1}{\varepsilon_X^2 - \varepsilon_X^1} & -\dfrac{1}{\varepsilon_X^2 - \varepsilon_X^1} \end{pmatrix} \quad (11.47)$$

通常，一个反应的弹性对其产物为负值，而对其底物为正值。这样，ε_X^1 是负值，ε_X^2 是正值，控制系数表达式中的分母是正值。这就使两个 FCCs 的值均为正的。通量控制的分布取决于相应的弹性系数值：大弹性系数与小的 FCC 值相联系，反之亦然。如果相应于该代谢物的第一个反应的弹性非常低，正如对一个实际上的不可逆反应，第一步反应的 FCC 将接近于 1，在这种情况下就产生一个真正的限速步骤。仅仅当相应于该代谢物的第一步反应的弹性为 0 时，即反应产物对反应速率绝对没有影响，这两个反应的 FCCs 值将精确地达到 1 和 0 而与代谢物的浓度无关。然而，甚至对实际上是不可逆的反应，相应于反应产物总是有一些弹性，一个真正的瓶颈反应实际上决不会达到。实际上具有瓶颈效应的反应是从不存在的。注意到下述情况是很有趣的：如果一条线性代谢途径中的所有反应都用不可逆的 Michaelis-Menten 动力学来描述，则相应于反应产物的弹性为零，而且除了第一步外的所有 FCCs 都等于零，第一步的 FCC 等于 1。然而在实际中很明显的是：如果第一步反应的酶活性急剧上升，中间代谢物的浓度将上升，最终第二步反应将变得被这种代谢物所饱和。这将使该反应相应于代谢物的弹性非常低，因而具有非常高的通量控制系数。确实，第二步反应活性的微小提高将对通量产生重要影响，因为很容易将积累的代谢中间物催化耗尽。还应注意：在这种情况下将产生一个病态方程组，从矩阵求逆中得到的解对于可利用的代谢物浓度数据可能是非常敏感的。

---

❶ 注意，此解同式（11.26）所表示的 MCA 的通式一致。在此例中这个通式取以下形式：

$$\begin{pmatrix} C_1^J & C_2^J \\ C_1^J & C_2^J \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} 1 & 0 \\ 0 & 1 \end{pmatrix} + \begin{pmatrix} \varepsilon_X^1 \\ \varepsilon_X^2 \end{pmatrix} \begin{pmatrix} C_1^X & C_2^X \end{pmatrix}$$

如果我们假定代谢物 X 对第一个反应的影响是负的而对第二个反应的影响是正的，则第一个反应的浓度控制系数为正值（意味着当反应速率增加时代谢物浓度也增加），而第二个反应的浓度控制系数为负值（意味着当第二个反应速率增加时代谢物浓度将变小）。如果至少一个弹性系数很大，则浓度控制系数将很小，反之亦然。因此，如果反应相应于代谢物浓度的变化是非常有弹性的，反应速率被调整至新的条件，变化着的反应速率将对代谢物浓度有很小的影响。

【例11.1】 青霉素生物合成途径的 MCA

对青霉素生物合成途径已经了解得很清楚［见 Nielsen（1996）的综述］。该途径中包括三步酶反应（见图 11.3），其中头两步在所有 β-内酰胺抗生素的生物合成途径中都

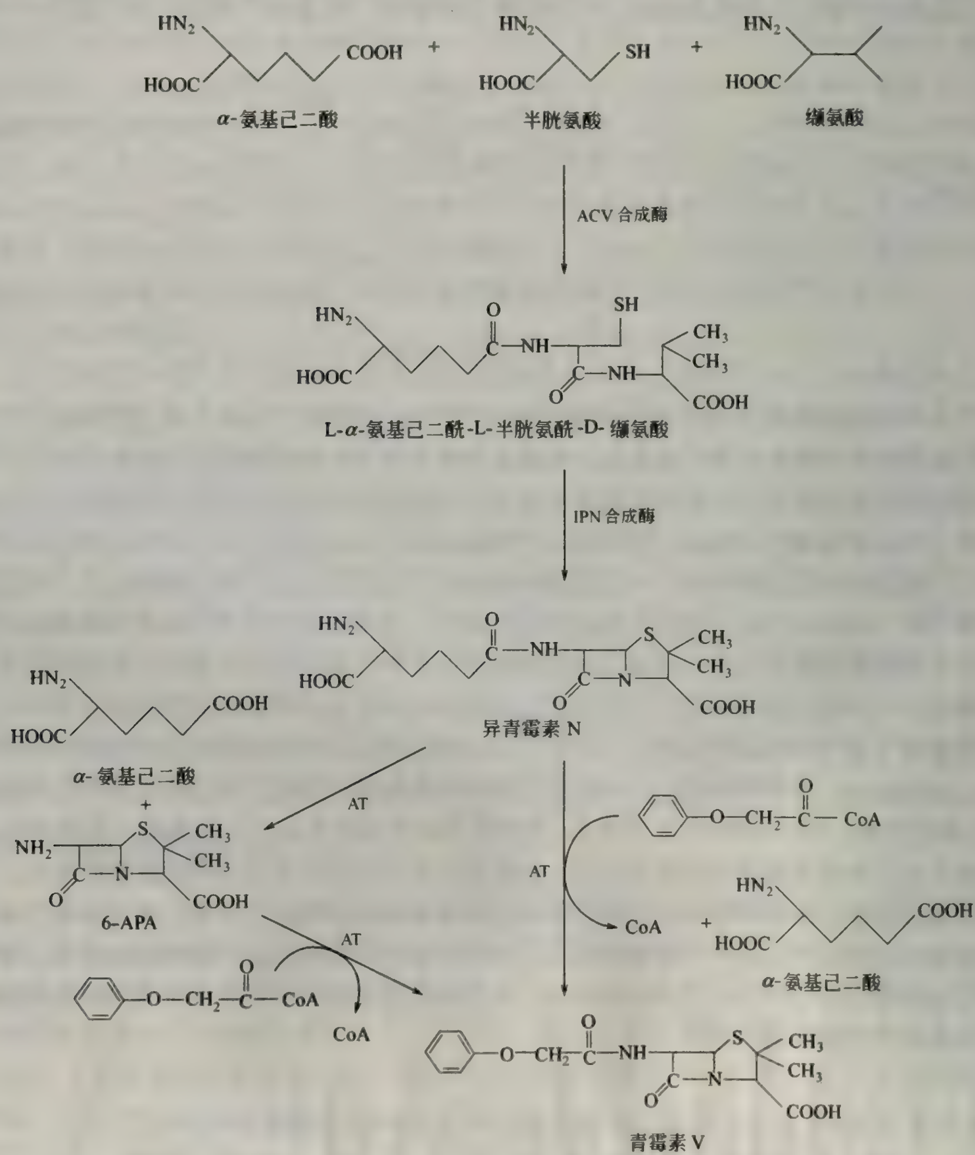


图 11.3　产黄青霉（*Penicillium chrysogenum*）中的青霉素生物合成途径

是一样的(不同生物的酶之间有很高的同源性)。途径中的第一步反应是三种氨基酸（L-α-氨基己二酸、L-半胱氨酸和 D-缬氨酸）缩合成 L-α-氨基己二酰- L-半胱氨酰-D-缬氨酸(LLD-ACV)。L-半胱氨酸和 L-缬氨酸是所有细胞代谢中众所周知的中间产物，而 L-α-氨基己二酸是真菌中合成赖氨酸的一个中间物。由一个单一多功能酶—— ACV 合成酶（ACVS）催化形成三肽 LLD-ACV。途径中第二步反应是 LLD-ACV 的氧化闭环反应以形成异青霉素 N。这一步是由异青霉素 N 合成酶用自由氧作为电子受体完成的。到青霉素 V 的最后转化是由乙酰辅酶 A：异青霉素酰基转移酶催化的，而且可以通过一个一步或两步的反应机制。在两步反应机制中，α-氨基己二酸的部分发生断裂并释放出 6-APA（6-氨基青霉烷酸)。如果一个活化的前体物即苯氧基乙酰辅酶 A 是可利用的，则 6-APA 就会和 AT（转酰氨酶）结合，随后被转变为青霉素 V。在一步反应机制中，α-氨基己二酸的异青霉素 N 侧链同前体物发生了交换，而没有从酶中释放出 6-APA。

Nielsen 和 Jorgensen（1995）已对这条途径进行了代谢控制分析。他们在分析中提出了前两个酶的动力学表达式，从 ACVS 和 IPNS 的动力学表达式确定了弹性系数，并用 MCA 定理计算了前两步反应的通量控制系数。从对最后一个酶（AT）活性的测定中得出结论，由 AT 施加的通量控制是最小的。这个结论后来被 Pissara 等（1996）对这条途径中的所有反应进行的更详细的分析所证实。

ACVS 已经表明，对于参与该合成酶反应的每一个氨基酸，都可以用 Michaelis-Menten 动力学来表示。Nielsen 和 Jϕrgensen（1995）在他们的分析中提出了由反应产物 LLD-ACV 的反馈抑制作用，因此，对于 ACVS 催化的反应，提出以下的动力学表达式：

$$r_{\mathrm{ACV}}=\frac{v_{\max}}{(1+K_{\mathrm{aaa}}c_{\mathrm{aaa}}^{-1}+K_{\mathrm{cys}}c_{\mathrm{cys}}^{-1}+K_{\mathrm{val}}c_{\mathrm{val}}^{-1})(1+c_{\mathrm{ACV}}K_{\mathrm{ACV}}^{-1})} \tag{1}$$

最近，*P. chrysogenum* 中的 ACVS 被提纯，并证实了 LLD-ACV 对其有反馈抑制作用(Theilgaard，et al，1992)。在式（1）中，$v_{\max}$是不同效应物的函数，这些效应物包括 ATP、AMP、焦磷酸盐、磷酸盐、CoA 和 Mg^{2+}，其中 ATP 对反应有促进作用而 AMP 和焦磷酸盐对反应有抑制作用。取三个米氏参数 K_{aaa}、K_{cys}和 K_{val}的值等于所报道的 *S. clavuligerus* 的值，即依次为 0.63mmol/L、0.12mmol/L 和 0.30mmol/L（当时对 *P. chrysogenum* ACVS 还没表征，其它 K_{m} 的应用对分析结果并无太大的影响)。K_{ACV}的值可以通过 r_{ACV}对通过青霉素生物合成途径的通量的拟合而估计出来。

异青霉素 N 合成酶（IPNS）是 β-内酰胺抗生素的生物合成途径中充分表征了的一个酶。该酶是一种依赖于铁的氧化酶，它从 LLD-ACV 中移走 4 当量氢，同时消耗 1mol 氧。已经从 *P. chrysogenum* 纯化出 IPNS（Ramos et al，1985)，其体外活性都需要分子氧、Fe^{2+}、二硫苏糖醇和抗坏血酸盐。这个酶和 LLD-ACV 浓度之间的关系可以用 Michaelis-Menten 动力学方程来表示，其 K_{m}值为 0.13mmol/L。此外，谷胱甘肽可能是该酶的竞争性抑制剂，其表观抑制常数 K_i 为 8.9mmol/L。目前还没有氧浓度对纯化的 IPNS 动力学影响的研究报道。但是对于从 *P. chrysogenum* 中部分纯化的 IPNS，Bainbridge 等（1992）发现当氧浓度在 0.070 ～ 0.18mmol/L 的范围内（对应于 25%～75%的空气饱和度)，该酶的动力学方程对氧是一级。这表示将 LLD-ACV 转变为异青霉素 N 的反应对溶解氧浓度的变化是非常敏感的。在对其它几个 β-内酰胺产品的实验中也观察到了这一点。基于这些结果，提出如下表达式用于 LLD-ACV 转化为异青霉素 N（IPN）的动力学：

$$r_{IPN}=\frac{v_{max}c_{ACV}}{c_{ACV}+K_m(1+c_{glut}K_i^{-1})} \quad (2)$$

其中两个参数 K_m 和 K_i 取自文献值，分别是 0.13mmol/L 和 8.9mmol/L。

从前体物氨基酸的胞内代谢库、LLD-ACV 及 ACVS 的活性等测量，就可以通过动力学表达式（1）计算出 LLD-ACV 的合成速率（r_{ACV}）。通过将计算出的速率与青霉素总合成测量进行拟合，可估计出 K_{ACV}值为 12.5mmol/L，这个值比纯化酶的值略高（Theilgaard et al，1997）。显然，在体外条件下所确定的抑制参数是在机理概念上的正确值，而从生产能力拟合所确定的值可能被体内存在的其它影响掩盖了。拟合值在通过 ACVS 催化的反应的实际通量与从动力学表达式预测的通量之间得到非常好的一致结果。因为对 IPNS 反应也发现非常一致，所以可得出结论：简单的动力学表达式（1）和表达式（2）可以很好地表示前两步反应的动力学，从而允许弹性系数和通量控制系数的精确确定。

对 ACVS 和 IPNS 反应的弹性系数可以首先通过对速率方程求偏导而得出：

$$\varepsilon_{ACTs}^{ACVS}=-\frac{c_{ACV}K_{ACV}^{-1}}{1+c_{ACV}K_{ACV}^{-1}} \quad (3)$$

$$\varepsilon_{ACV}^{IPNS}=\frac{K_m(1+c_{glut}K_i^{-1})}{c_{ACV}+K_m(1+c_{glut}K_i^{-1})} \quad (4)$$

式（3）和式（4）表明弹性系数是谷胱甘肽和 LLD-ACV 浓度的函数。由于反馈抑制，第一个反应相应于 LLD-ACV 的弹性系数为负值，而第二个弹性系数为正值。流加培养期间，胞内途径代谢物的浓度发生变化，因此不能严格满足稳态假定。然而从时间尺度分析已经发现整个流加过程中，尽管积累了很多 LLD-ACV，途径代谢物库处于拟稳态（Pissara et al，1996），这样，MCA 理论仍然是适用的。通过对谷胱甘肽和 LLD-ACV 瞬时浓度的测定，已计算出流加培养期间在不同时间时的弹性系数，如图 11.4 所示。

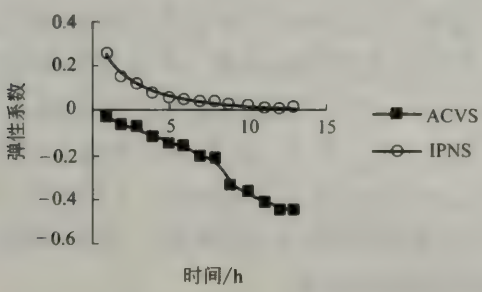


图 11.4　在流加培养期间两个酶 ACVS 和 IPNS 相应于 LLD-ACV 的弹性系数
注意：ACVS 的弹性系数是负值

要注意到，对于 ACVS，弹性系数是负的，也就是说，增加着的 LLD-ACV 浓度将减小由 ACVS 催化的 LLD-ACV 合成速率；在整个流加培养的过程中，由于不断增加着的 LLD-ACV 浓度使弹性系数的值也变大。在另一方面，对于 IPNS，弹性系数值为正值，也就是说，LLD-ACV 浓度不断增加所产生的影响是正的，但是当 IPNS 变得由 LLD-ACV 饱和时，弹性系数在整个流加期间将减小。

通量控制系数是用式（11.47）从弹性系数计算出的，结果如图 11.5 所示。最初，对于 ACVS的通量控制系数是高的（接近于 1），因为几乎不存在来自中间物 LLD-ACV 的抑制。但是，当 LLD-ACV 的浓度增大时，通量控制逐渐由 ACVS 转移到 IPNS，并在培养大约70h之后，通量基本上由 IPNS 所控制。随着通量控制从 ACVS 到 IPNS 的转移，这两个酶没有哪个能被看做限速酶。这证明对一个给定的代谢途径，FCCs 值并不是恒定不变的。

另一个有趣的观察是：式（2）所推荐的 IPN 形成的动力学揭示溶氧浓度的增加将导致通过途径的通量的显著增加，这是因为 IPNS 活性的微小增加将阻止 LLD-ACV 的积累并因此而防止了对 ACVS 的抑制。Pissara 等（1996）对该途径用一个完整的动力学模型（即用图 11.3 中所考虑到的所有反应）来检验溶氧对青霉素生物合成的影响。他们发现：合成青霉素的代谢通量确实对溶氧的浓度很敏感，在溶氧浓度低的情况下，对于 IPNS 的 FCC 将增加。这一发现最近已被 Henriksin 等（1997）用实验证实，他们发现：在一个以葡萄糖限制的恒化器中，在低溶氧浓度下，LLD-ACV 的浓度将逐渐上升。从式（3）和式（4）中明显可以看出，对 ACVS 催化的反应，这将导致一个数值上很大的弹性系数，对 IPNS 催化的反应，则为一个较小的弹性系数，这再次意味着对 IPNS 有更高的 FCC。

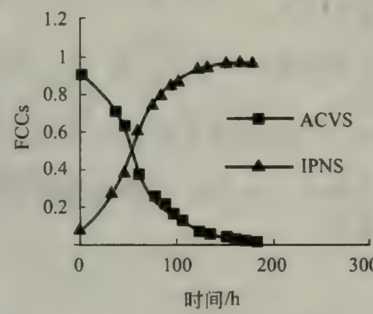


图 11.5　在流加培养期间两个酶 ACVS 和 IPNS 的通量控制系数

从这些弹性系数，用式（11.47）也可以计算出浓度控制系数。对于 ACVS，其浓度控制系数在流加培养的开始阶段大约为 5，在培养结束时大约降至 2。这表明代谢库对 ACVS 活性变得不太敏感了。这也是 LLD-ACV 积累的结果，因为在高浓度时的反馈抑制使反应速率及代谢物浓度对酶活性变化不太敏感了。

11.4　分支途径的 MCA

分支（代谢）途径 MCA 的应用包括额外的复杂度。首先，我们要处理多于一个单一通量的情况（单一通量是线性途径的情况）。分支途径中的每一个通量都可能受到代谢网络中任何酶反应的影响，这就需要一个能够对通量控制进行完整描述的通量控制系数矩阵。第二，分支代谢途径中的代谢物的数目少于 $L-1$（L 是反应数），一般来说，连接定理和加和定理并不能提供足够数目的方程以便从弹性系数计算控制系数。但是，在这种途径中，通量并不是独立的，通量之间的守衡方程将产生附加的限制，这也允许从酶的弹性来确定控制系数。这些限制已被称作结构关系（Reader，1988），它们由网络中反应的化学计量学所确定。其结果是将有恰好足够的结构关系以弥补“缺少的”方程，以致控制系数总能由弹性系数来计算。结构关系公式构建相对来说是复杂的。为了有利于一般情况的表示，将首先讨论如图 11.6 所示的简单分支途径。

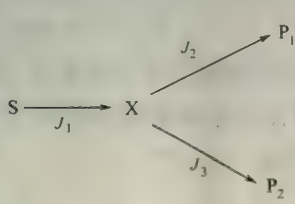


图 11.6　含有一个分支点代谢物 X，一种底物 S，两种代谢产物 P_1 和 P_2 的简单分支途径

图 11.6 所示的三个通量 J_1、J_2 和 J_3 在稳态条件下并不是独立的，因为它们通过围绕途径中代谢物 X 的质量平衡而被关联起来：

$$J_1 = J_2 + J_3 \tag{11.48}$$

或

$$1 = f_{12} + f_{13} \tag{11.49}$$

其中 f_{1k} 是分数通量，由下式求出：

$$f_{1k} = \frac{J_k}{J_1}, \quad k \in \{2,3\} \tag{11.50}$$

如果导入一个扰动使得 J_2 发生改变而 J_1 保持不变，那么由式（11.48）表示的结构关系式直接表明 J_3 也必须变化。这就对通量控制系数加入一个限制，这是由 Kacser（1983）首先推导出的：

$$-f_{12}C_3^{J_1}+f_{13}C_2^{J_1}=0 \tag{11.51}$$

结合连接定理和加和定理，这个方程允许我们从弹性系数和通过分支途径之一的分数通量来计算 FCCs：

$$\begin{pmatrix} C_1^{J_1} \\ C_2^{J_1} \\ C_3^{J_1} \end{pmatrix}=\frac{1}{\varepsilon_X^1-f_{12}\varepsilon_X^2-(1-f_{12})\varepsilon_X^3}\begin{pmatrix} -f_{12}\varepsilon_X^2-(1-f_{12})\varepsilon_X^3 \\ f_{12}\varepsilon_X^1 \\ (1-f_{12})\varepsilon_X^1 \end{pmatrix} \tag{11.52}$$

在方程式（11.51）中参考通量取为 J_1，但类似的结构关系对途径中其它两个通量的 FCCs 也成立：

$$(1-f_{12})C_1^{J_2}+C_3^{J_2}=0 \tag{11.53}$$

$$f_{12}C_1^{J_3}+C_2^{J_3}=0 \tag{11.54}$$

式（11.53）[或式（11.54）] 与加和定理和连接定理结合，得到计算其它两个通量 J_2 和 J_3 的 FCCs 的类似表达式 [见式（11.68）和式（11.69）]。

在更复杂的途径中，在每一个分支点几个反应都可能正在发生，可以推导出类似的方程。Fell 和 Sauro（1985）通过关联导向和离开一个分支（Branch）点代谢物 X_j 的不同分支途径的 FCCs 推导出方程（11.55），导向代谢物的通量取为 J_i，通过第 k 个分支的分数通量是 f_{ik}，即通过这个分支的通量是 J_k。

$$-f_{1k}\sum_{\text{Branch}k}C_k^{J_i}+(1-f_{ik})\sum_{\text{Branch}m}C_m^{J_i}=0 \tag{11.55}$$

通过运用反应分组和自上而下 MCA 的概念，式(11.55)中的几个加和只不过是参与相应分支反应的组 FCC。因此，上述方程是式(11.51)的组类似方程。如果途径中进一步分支，式(11.55)的加和(或，等价地，反应组)将包括出自代谢物 X_j 的每一个分支的所有亚分支中的全部 FCCs。

注意到在式（11.53）和式（11.54）中两项的符号都为正，而式（11.51）中两项的符号相反。如果通量 J_2增加而 J_1 不变，则 J_3 必然变小，反之亦然。这就解释了式（11.51）中符号的不同。相反地，当通量 J_2 增加而 J_3 保持不变时，则 J_1 也必然增加，这就解释了式（11.53）和式（11.54）中的符号为什么都为正的。显然，化学计量学也在起作用。这已由 Reder（1988）所做的工作所证明，他推导了一组包含了 MCA 理论和由化学计量学限制所施加的结构关系的一组通用方程式。通过这组方程，就有可能推导出 MCA 系数中所有的独立关系，甚至对非常复杂的途径也行❶。由 Reader（1997）导出的结构关系是以非定标的(nonscaled）控制系数为基础的，但 Ehlde 和 Zacchi（1997）也推导出了定标的（scaled）控制系数的类似结构关系，下面将提供这些一般关系的推导。

考虑一个包括 K 个中间代谢物通过 L 个酶反应相互连接的反应网络，可以写出 K 个通量平衡式，每一个对应于网络中的每一个代谢物。通过导入 $L\times K$ 化学计量矩阵 **G** 和 $L\times 1$ 通量向量 **J**，这些通量平衡式可概括为下面的矩阵方程，它等同于式（8.3）❷：

---

❶ 在前面的分析中并没有包括代谢循环，对于代谢循环可以规定另外一组关系式（FellSauro，1985）。

❷ 在此，关于胞内代谢物的化学计量矩阵 G 的定义不允许存在有线性相关的行（或线性相关的代谢物），因此它仅含有辅因子对（例如 NAD^+ 和 NADH）中两个化合物之一。在 Ehlde 和 Zacchi（1997）的分析中 [还有 Reder（1988）的分析]，在对化学计量矩阵的说明中没有此要求，因此他们的分析方法更为通用（但也更复杂）。

$$\mathbf{G}^{\mathrm{T}}\mathbf{J} = 0 \tag{11.56}$$

这个表达式表示连接着 L 个稳态通量的 K 个线性方程，而且很明显，通过重排公式，可以把 K 个通量［称作非独立的通量（dependent fluxes）］指定为剩下的 $L-K$ 个通量［独立通量（independent fluxes）］的线性函数。为此，将化学计量矩阵中含有非独立通量的行集中在子矩阵 $\mathbf{G}_c$ 中，剩下的行集中在亚矩阵 $\mathbf{G}_0$ 中，式（11.56）重写为：

$$\mathbf{G}_c^{\mathrm{T}}\mathbf{J}_{\mathrm{dep}} + \mathbf{G}_0^{\mathrm{T}}\mathbf{J}_{\mathrm{in}} = 0 \tag{11.57}$$

子矩阵 $\mathbf{G}_c$ 是 一个非奇异方阵，因此独立通量可通过式（11.58）由非独立通量来计算：

$$\mathbf{J}_{\mathrm{dep}} = -(\mathbf{G}_c^{\mathrm{T}})^{-1}\mathbf{G}_0^{\mathrm{T}}\mathbf{J}_{\mathrm{in}} \tag{11.58}$$

此式等同于式（8.8），是确定性系统（determined system）的代谢通量分析的基础。通过式（11.58），所有的通量能以非独立通量的形式表示如下：

$$\mathbf{J} = \mathbf{L}^{\mathrm{J}}\mathbf{J}_{\mathrm{in}} \tag{11.59}$$

其中矩阵 $\mathbf{L}^{\mathrm{J}}$ 由下式算出：

$$\mathbf{L}^{\mathrm{J}} = \begin{bmatrix} \mathbf{I}_{L-K} \\ -(\mathbf{G}_c^{\mathrm{T}})^{-1}\mathbf{G}_0^{\mathrm{T}} \end{bmatrix} \tag{11.60}$$

式中，$\mathbf{I}_{L-K}$是维数为 $(L-K)\times(L-K)$ 的单位矩阵。由于式（11.59）实质上提供出这些通量之间的结构关系，Ehlde 和 Zacchi（1997）推导出了一个由独立的 FCCs 确定 FCC 的通式（见方框 11.4）：

$$\mathbf{C}^{\mathrm{J}} = \mathbf{L}_{\mathrm{F}}^{\mathrm{J}}\mathbf{C}_{\mathrm{in}}^{\mathrm{J}} \tag{11.61}$$

式中，矩阵 $\mathbf{L}_{\mathrm{F}}^{\mathrm{J}}$ 是矩阵 $\mathbf{L}^{\mathrm{J}}$ 中的每一个元素 l_{jk}同式（11.50）所给出的分数通量 f_{jk}相乘而得到的，将式 11.61 代入式（11.27）所给出的 MCA 系数之间的一般关系式，得到：

$$\mathbf{L}_{\mathrm{F}}^{\mathrm{J}}\mathbf{C}_{\mathrm{in}}^{\mathrm{J}} = \mathbf{P} + \mathbf{E}\mathbf{C}^{\mathrm{X}} \tag{11.62}$$

其可重排成：

$$(\mathbf{L}_{\mathrm{F}}^{\mathrm{J}} - \mathbf{E})\begin{bmatrix} \mathbf{C}_{\mathrm{in}}^{\mathrm{J}} \\ \mathbf{C}^{\mathrm{X}} \end{bmatrix} = \mathbf{P} \tag{11.63}$$

这就是从弹性系数、参数弹性系数和通过途径的不同分支的分数通量来确定控制系数的通式。注意，式（11.45）仅对线性代谢途径有效，它可从式（11.63）中导出，后者适用于各种类型途径结构。Ehlde 和 Zacchi（1997）在对式（11.65）的推导中允许非独立代谢物的存在（如辅因子对中的两种化合物的存在），这就需要引入另一个矩阵，该矩阵将所有的浓度控制系数表示为独立浓度控制系数的函数。先前曾假定不存在非独立代谢物，即在化学计量矩阵 $\mathbf{G}$ 中不存在线性相关的列。正常情况下，化学计量式经过在整理后很容易满足这一要求，而且如果存在线性相关列的话，可以在不违反通用性原则的情况下除去一个或多个线性相关的代谢物。

方框 11.4　式（11.61）的推导

式（11.61）推导的出发点是途径中所有通量和独立通量之间的关系，正如式（11.59）所给出。对 E_i 微分得到：

$$\frac{\mathrm{d}\mathbf{J}}{\mathrm{d}E_i} = \mathbf{L}^{\mathrm{J}}\frac{\mathrm{d}\mathbf{J}_{\mathrm{in}}}{\mathrm{d}E_i} \tag{1}$$

或

$$\frac{\mathrm{d}J_k}{\mathrm{d}E_i} = \sum_{m=1}^{L-K} l_{km}\frac{\mathrm{d}J_{\mathrm{in},m}}{\mathrm{d}E_i} \tag{2}$$

由 E_i/J_k 乘以式（2）得到

$$C_i^{J_k} = \sum_{m=1}^{L-K} l_{km} \frac{E_i}{J_k} \times \frac{J_m}{J_m} \times \frac{\mathrm{d}J_{\mathrm{in},m}}{\mathrm{d}E_i} \tag{3}$$

或

$$C_i^{J_k} = \sum_{m=1}^{L-K} l_{km} \frac{J_m}{J_k} C_{\mathrm{in},i}^{J_m} = \sum_{m=1}^{L-K} l_{km} f_{km} C_{\mathrm{in},i}^{J_m} \tag{4}$$

由于 $l_{km}f_{km}$ 是矩阵 $\mathbf{L}_\mathrm{F}^\mathrm{J}$ 中第 k 行 m 列的元素，因此式（4）被看成等同于式（11.61）。

为了对式（11.63）的应用进行说明，回到图 11.6 中所示的简单代谢途径。对于此途径，化学计量矩阵 $\mathbf{G}$ 为：

$$\mathbf{G} = \begin{pmatrix} 1 \\ -1 \\ -1 \end{pmatrix} \tag{11.64}$$

因为有三个通量（$L=3$）和一个代谢物（$K=1$），因此有两个独立的通量和一个非独立通量。如果 J_3 被取为非独立通量，则 $\mathbf{L}^\mathrm{J}$ 变成：

$$\mathbf{L}^\mathrm{J} = \begin{pmatrix} 1 & 0 \\ 0 & 1 \\ 1 & -1 \end{pmatrix} \tag{11.65}$$

下一步是用 f_{jk} 乘以 $\mathbf{L}^\mathrm{J}$ 中的元素得到 $\mathbf{L}_\mathrm{F}^\mathrm{J}$：

$$\mathbf{L}_\mathrm{F}^\mathrm{J} = \begin{pmatrix} 1 & 0 \\ 0 & 1 \\ f_{31} & -f_{32} \end{pmatrix} \tag{11.66}$$

以及从式（11.63）得：

$$\begin{pmatrix} 1 & 0 & -\varepsilon_\mathrm{X}^1 \\ 0 & 1 & -\varepsilon_\mathrm{X}^2 \\ f_{31} & -f_{32} & -\varepsilon_\mathrm{X}^3 \end{pmatrix} \begin{pmatrix} C_1^{J_1} & C_2^{J_1} & C_3^{J_1} \\ C_1^{J_2} & C_2^{J_2} & C_3^{J_2} \\ C_1^\mathrm{X} & C_2^\mathrm{X} & C_3^\mathrm{X} \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} 1 & 0 & 0 \\ 0 & 1 & 0 \\ 0 & 0 & 1 \end{pmatrix} \tag{11.67}$$

当用式（11.67）来计算控制系数时，通量 J_3 的 FCCs 可以从式（11.61）中获得。式（11.67）的解看起来似乎冗长乏味，总共包括 9 个方程，但是其结果可立刻给出所有的控制系数。而且，有几种软件包将很容易对矩阵方程进行数值求解，或者甚至可导出解析解。这样通过解式（11.67），得到：

$$\begin{pmatrix} C_1^{J_1} & C_2^{J_1} & C_3^{J_1} \\ C_1^{J_2} & C_2^{J_2} & C_3^{J_2} \\ C_1^\mathrm{X} & C_2^\mathrm{X} & C_3^\mathrm{X} \end{pmatrix} = \frac{1}{f_{31}\varepsilon_\mathrm{X}^1 - f_{32}\varepsilon_\mathrm{X}^2 - \varepsilon_\mathrm{X}^3} \times \begin{pmatrix} -\varepsilon_\mathrm{X}^3 - f_{32}\varepsilon_\mathrm{X}^2 & f_{32}\varepsilon_\mathrm{X}^1 & \varepsilon_\mathrm{X}^1 \\ -f_{31}\varepsilon_\mathrm{X}^2 & f_{31}\varepsilon_\mathrm{X}^1 - \varepsilon_\mathrm{X}^3 & \varepsilon_\mathrm{X}^2 \\ f_{31}\varepsilon_\mathrm{X}^3 & f_{32}\varepsilon_\mathrm{X}^3 & f_{31}\varepsilon_\mathrm{X}^1 - f_{32}\varepsilon_\mathrm{X}^2 \end{pmatrix} \tag{11.68}$$

利用式（11.61），就可以得到通量 J_3 的 FCCs：

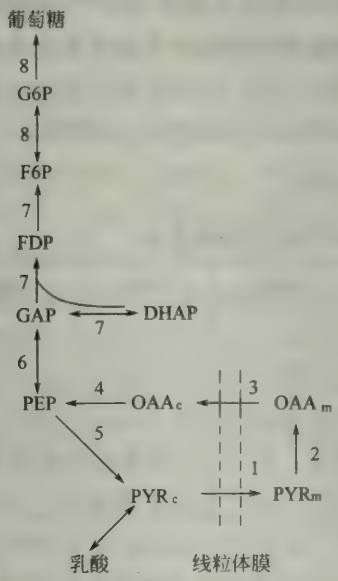
$$\begin{pmatrix} C_1^{J_3} \\ C_2^{J_3} \\ C_3^{J_3} \end{pmatrix} = \frac{1}{f_{31}\varepsilon_\mathrm{X}^1 - f_{32}\varepsilon_\mathrm{X}^2 - \varepsilon_\mathrm{X}^3} \begin{pmatrix} -f_{31} \\ f_{32} \\ 1 \end{pmatrix} \tag{11.69}$$

式（11.68）中的第一行如果乘以 J_3 并除 J_1 就等同于式（11.52）的解［由此，分数通量转

换为 f_{12}和 f_{13}，并应用于式（11.49）中]。除了给出所有的 FCCs 值之外，矩阵的解也直接给出了浓度控制系数。

【例 11.2】 鼠肝脏细胞中的糖异生和糖酵解途径

几乎没有研究报道，通过测定所有相关的弹性系数一条代谢途径的 FCCs 已被确定。然而，在对鼠肝胀细胞中糖异生途径的详细研究中，Groen 等（1983，1986）确定了在高浓度乳酸和丙酮酸的条件下这条途径中的所有 FCCs。这条途径如图 11.7 所示。他们在分析中通



1—线粒体丙酮酸转位蛋白；
2—丙酮酸羧化酶（PC）；
3—草酰乙酸的运输；
4—磷酸烯醇丙酮酸激酶（PEPCK）；
5—丙酮酸激酶（PYK）；
6—烯醇酶，磷酸甘油酸变位酶（PGM），
3-磷酸-甘油醛脱氢酶（GAPDH）
和 3-磷酸甘油酸激酶（3PG）；
7—磷酸丙糖异构酶（TPI）；
8—磷酸葡萄糖异构酶（PGI），
葡萄糖-6-磷酸酶（G6PE）
缩写：FDP—1,6-二磷酸果糖；
DHAP—磷酸二羟丙酮
下标：m—线粒体；c—细胞质

图 11.7 糖异生途径略图

过酶动力学、单调节法或双调节法确定了弹性系数。在利用酶动力学确定弹性系数的过程中，他们用式(2)和式(3)，这是基于可逆的米氏动力学方程：

$$v = v_f - v_r = \frac{v_{f,max}c_S/K_S - v_{r,max}c_P/K_P}{1 + c_S/K_S + c_P/K_P} \tag{1}$$

式中，c_S 和 c_P 分别是该酶反应的底物和产物的浓度；$v_{f,max}$和 $v_{r,max}$分别是最大正、逆反应速率。用这些动力学，得到了相应于产物和底物的反应的弹性系数：

$$\varepsilon_S^v = \frac{c_S}{v} \times \frac{\partial v}{\partial c_S} = \frac{1}{1 - \Gamma/K_{eq}} - \frac{v_f}{v_{f,max}} \tag{2}$$

$$\varepsilon_P^v = \frac{c_P}{v} \times \frac{\partial v}{\partial c_P} = \frac{1}{1 - \Gamma/K_{eq}} - \frac{v_r}{v_{r,max}} \tag{3}$$

式中，v_f 和 v_r 分别是正反应和逆反应的速率；Γ 是质量作用率。可由式（4）算出：

$$\Gamma = \frac{c_P}{c_S} \tag{4}$$

而 K_{eq}是平衡常数，由下式算出：

$$K_{eq} = \frac{c_{P,eq}}{c_{S,eq}} = \frac{v_{f,max}}{v_{r,max}} \times \frac{K_P}{K_S} \tag{5}$$

如果酶在远离平衡时起作用，即 $\Gamma/K_{eq} \ll 1$ 时，则弹性系数几乎仅由式（2）和式（3）中的最后一项，也就是酶被底物和产物所饱和的程度来确定。另一方面，如果酶在接近平衡时起

作用，即 $\Gamma/K_{eq}\approx1$，则弹性系数主要由式（2）和式（3）中的第一项来确定。

表 11.2 中总结了所确定的弹性系数。对于丙酮酸运转蛋白（反应 1）来说，对线粒体和胞质溶胶两处的丙酮酸的测量（在乳酸和丙酮酸的高饱和浓度下进行）表明了比值 Γ/K_{eq} 为 0.860 ± 0.11，得出这一步反应在接近于平衡的条件下运行的结论。丙酮酸脱羧酶在远离平衡的情况下工作，因此这步反应的弹性系数由式（2）和式（3）中的最后一项所决定。为了计算相应于丙酮酸的弹性系数，从流向葡萄糖的通量和通过丙酮酸激酶反应的通量确定了正反应速率。类似地，从流向葡萄糖的最大通量确定了最大正反应速率。草酰乙酸运输步骤的弹性系数通过双调节法确定。通过改变底物浓度或用 3-巯基-吡啶甲酸抑制 PEP 羧激酶的活性，通过这一步的通量会被改变。从草酰乙酸浓度的相应变化的测量就可以确定弹性系数。对于 PEP 羧激酶，弹性系数也是通过式（2）和式（3）计算出的。正反应速率作为净通量与逆反应的速率之和被确定，即 $v_f=v+v_r$。因为 $v_r/v_f=\Gamma/K_{eq}$，得到：

$$v_f=\frac{v}{1-\Gamma/K_{eq}} \tag{6}$$

表 11.2　图 11.7 中所示途径的弹性系数

反　应	PYR_c	PYR_m	OAA_m	OAA_c	PEP	GAP	G6P
1	7.1	−6.1					
2		0.05	−0.04				
3			0.86	−0.74			
4				0.35	−0.09		
5					3.5		
6					2.0	−1.0	
7						1.2	−0.08
8							1.0

注：假定没有数值的栏中的弹性系数为 0。

通过此反应的净通量又从葡萄糖生成速率和通过丙酮酸激酶反应的通量来确定，而从质量作用比的测量可以确定正反应速率。对丙酮酸激酶的弹性系数通过单调节法确定（注意，假定此步反应为不可逆反应，相应于丙酮酸的弹性系数为零），通过改变 PEP 的浓度并测定相应的通量，可以直接确定弹性系数。对于烯醇化酶、磷酸甘油变位酶（PGM）、3-磷酸甘油醛脱氢酶（GAPDH）和 3-磷酸甘油激酶（3PG）所催化的反应组，发现在所有条件下，所有反应接近于平衡，而测得 Γ/K_{eq} 为 0.51。磷酸丙糖异构酶（TPI）、醛缩酶和果糖-1,6-二磷酸酶所催化的反应组被认为是一个反应，其弹性系数由式（7）确定：

$$\frac{dJ_{glc}}{J_{glc}}=\varepsilon^7_{GAP}\frac{dc_{GAP}}{c_{GAP}}+\varepsilon^7_{F6P}\frac{dc_{F6P}}{c_{F6P}}+\varepsilon^7_{P_i}\frac{dc_P}{c_P} \tag{7}$$

相应于自由磷酸的弹性系数假定是很小，因此最后一项可以忽略不计。从酶动力学知识可知，相应于 6-磷酸果糖（假定 6-磷酸果糖和 6-磷酸葡萄糖一起组成一个共同库）的弹性系数确定为 −0.08。dc_{F6P}/c_{F6P} 这一项并不是很大，因此式（7）中的第二项也可以忽略不计。这就允许通过测定不同 GAP 浓度时的通量来确定相应于 GAP 的弹性系数。最后已知葡萄糖-6-磷酸酶所催化的反应在远离平衡的条件下进行，发现葡萄糖-6-磷酸的浓度远低于 K_m 值，因此在所有条件下的弹性系数大约为 1。

从所确定的弹性系数可以计算通量控制系数，其结果汇总于表 11.3。观察到有几个步骤反应在接近平衡条件下进行，FCC 非常低。然而，被假定处于平衡状态的将 PEP 转化为 1,6-二磷酸果糖的组合反应有相对高的 FCC，因此不可能得出平衡反应不能表示通量控制这样的一般性结论。最高的 FCC 是对丙酮酸羧化酶反应（注意，这一步也有最低的弹性系

数），这个反应当然就是糖异生的一个关键反应。然而，有趣的是，PEP 羧激酶有非常低的

表 11.3　图 11.7 中所示途径的通量控制系数

反　应	FCCs	反　应	FCCs
1. 丙酮酸转位蛋白	0.004	5. 丙酮酸激酶	−0.17
2. 丙酮酸羧化酶	0.51	6. 烯醇酶/PGM/GAPDH/3PK	0.29
3. 草酰乙酸的运输	0.02	7. TIM/醛缩酶/1,6-二磷酸果糖酶	0.27
4. 磷酸烯醇丙酮酸羧激酶	0.05	8. PGI/6-磷酸葡萄糖酶	0.02

注:FCCs 是流向葡萄糖的通量。

FCC，这一定是因为此反应与丙酮酸羧化酶紧密耦联的结果，后者具有高的通量控制。丙酮酸激酶明显有一个负的 FCC 值，这证明了分支途径中有负的 FCCs 的出现。

Groen 等（1983，1986）也确定了在乳酸浓度不高的条件下（对应于 5 mmol/L）的 FCCs。对于不断减少着的乳酸浓度，丙酮酸羧化酶的 FCC 值进一步上升（在 0.5 mmol/L 乳酸时上升至 0.75）。当添加糖异生途径的刺激物——胰高血糖素后，存在着通量控制的完全转移。这样丙酮酸激酶表示没有通量控制，丙酮酸羧化酶的 FCC 上升至 0.83。此外，由 PEP 到 1,6-二磷酸果糖的转化有非常低的 FCC（0.003），由 1,6-二磷酸果糖到葡萄糖的进一步转化反应的 FCC 也较低（0.03），其它反应的 FCC 近似一样。因此，在这些条件下，PEP 羧激酶是具有第二个最大的 FCC（0.08）的反应步骤。

Groen 等（1983，1986）的分析精确彻底，而且如前所述，这是一个对完整途径进行分析的好范例。但是他们确定的 FCCs 值，如 Ehlde（1995）证明的那样，具有相当高的标准偏差，所估计 FCCs 的标准偏差在 50%～275% 的范围内变化，尤其对于小的 FCCs，标准偏差特别高。但即使存在这些高标准偏差，它仍然可以清楚地表明通量控制主要是在丙酮酸羧化酶。

【例 11.3】　氧化磷酸化

Brand 及其同事们已经在分离到的线粒体中分析了氧化磷酸化作用的控制（Brand et al, 1988; Brown et al, 1990b; Hafner et al, 1990）。这个系统由三个反应组代表，通过质子动力（the proton-motive force）Δp 相联系，如图 11.8 所示。以这种反应分组，应用了自上而下的方法。注意到因为质子动力是三个反应组之间的惟一联系，因此可以应用此法。

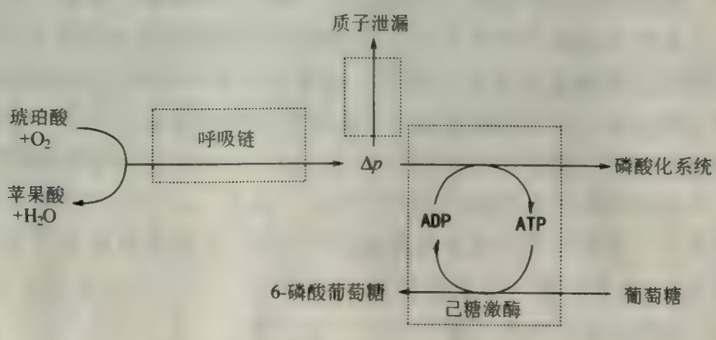


图 11.8　呼吸作用中三个反应组的略图

琥珀酸是呼吸作用的底物，当电子通过电子传递链被泵出线粒体后将产生一个质子动力 Δp（见图 2.11）。质子动力可以促进 F_0F_1——ATPase 催化产生 ATP，也可以发生泄漏。为了再生 ATPase 的底物 ADP，加入了己糖激酶和葡萄糖。磷酸化作用系统也包括腺嘌呤核苷酸转位蛋白，它可以穿过线粒体膜运输 ATP 和 ADP

在分析中以如下两种不同方式对质子动力进行扰动。

● 加入不同量的质子解耦剂，如羰基氰化物——对三氟甲氧基苯腙（FCCD），它可以穿越线粒体膜运输质子。

● 加入丙二酸盐，抑制呼吸链。

由此，每组反应相应于 Δp 的弹性系数可以从单调节法实验来确定，从呼吸通量-Δp 数据的线性回归，对质子泄漏和非磷酸氧化条件下呼吸的弹性系数就可估计出[1]：

$$\varepsilon_{\Delta p}^{\text{resp}}=-18.7;\ \varepsilon_{\Delta p}^{\text{leak}}=7.9 \tag{1}$$

式中，上标 resp 表示呼吸；leak 表示泄漏。

其相应的 FCCs 为：

$$C_{\text{leak}}^{J_{\text{resp}}}=0.70;\ C_{\text{resp}}^{J_{\text{resp}}}=0.30 \tag{2}$$

这样，在这些条件下，泄漏对通量起着重要的控制作用，质子动力的移除比质子动力的产生具有更大的通量控制。

在对这个完整系统的分析中，Brown 等（1990b）利用 ATPase 的抑制剂（寡霉素）与 FCCP一起通过抑制剂实验确定了相应于 Δp 的弹性系数和饲养细胞（fed cells）中的 FCCs。表 11.4 总结了他们的分析结果。对于呼吸通量，所有的 FCCs 是正的，而对于非磷酸化作用条件，通量控制主要在质子动力移走的过程中，而磷酸化作用具有最大的 FCC，这与 Groen 等（1982）的发现是一致的，后者发现了与呼吸作用有关的反应步骤有低的 FCCs（见表 11.1）。对于质子泄漏和磷酸化作用的通量，由它们自己的步骤，存在着最大的通量控制，而其它的质子动力泄漏步骤有一个负的 FCC 值。Brown 等（1990b）对饥饿细胞中的情况也进行了研究，发现了非常类似的 FCCs 值，这表明先前的结论对于这个系统总体上是适用的。

表 11.4 氧化磷酸化作用的弹性系数和 FCCs

性　　质	呼吸作用	泄　　漏	磷酸化作用
$\varepsilon_{\Delta p}^{J_i}$	-7.65 ± 0.21	4.69 ± 0.78	2.77 ± 1.03
$C_i^{J_{\text{resp}}}$	0.29 ± 0.05	0.22 ± 0.04	0.49 ± 0.04
$C_i^{J_{\text{leak}}}$	0.42 ± 0.03	0.87 ± 0.01	-0.29 ± 0.04
$C_i^{J_{\text{Phos}}}$	0.23 ± 0.07	-0.07 ± 0.03	0.84 ± 0.05

在另一项研究中，确定了在不同呼吸速率下通过呼吸途径的通量（Hanfer 等，1990）。在低呼吸速率下，通量控制主要由质子泄漏执行，随着呼吸速率的增加，质子泄漏所决定的通量控制降到一个非常低的值（几乎为 0），而磷酸化作用的通量控制升至约 0.8。当呼吸速率非常高时，则磷酸化的通量控制又下降了，通量控制由呼吸作用和磷酸化作用所大致均分。类似地，其它两步反应在不同呼吸速率下的通量控制也被确定。对于磷酸化通量，除了在呼吸速率非常高的以外，磷酸化本身有大部分控制。在呼吸速率非常高时，对磷酸化作用的通量的控制几乎由呼吸作用和磷酸化作用所均分。然而，对于质子泄漏，情况要更复杂一些。在低呼吸速率下，通量控制主要在泄露反应组本身。在高呼吸速率下，泄漏反应对于本身的通量仍然有高的通量控制，但此时磷酸化作用有一个大的负通量控制（一个约等于 -1.0的 FCC 值）和呼吸途径的大通量控制（一个约等于 1.0 的 FCC）。这证明在分支途径

[1] Ehlde（1995）分析了 Brand 等（1988）的数据，他在双对数坐标上对数据进行了线性回归，给出对实验数据的更好的拟合。从分析中他得出 $\varepsilon_{\Delta p}^{\text{resp}}=-12.9$；$\varepsilon_{\Delta p}^{\text{leak}}=10.9$。相应的 FCCs 值分别为 $C_{\text{leak}}^{J_s}=0.54$；$C_{\text{resp}}^{J_{\text{resp}}}=0.46$，这和式（2）中的结果是很不同的。

中的 FCCs 值有一种比较复杂的解释，这里一个 FCC 接近于 1.0 并不意味着其它步骤就没有通量控制作用了。

前已提及，Brand 及其同事们的分析是基于将氧化磷酸化途径中的各个单个反应步骤汇总为三个反应组（通过自上而下法）。如果想得到关于一个反应组中单个反应的更多信息，则需要一个更详细的分析。但是，常常有可能得出关于这些反应组中各单个步骤所做贡献的一些定性结论。因此，组 FCCs 就直接给出了各单个反应的信息。在图 11.8 所示的磷酸化反应组中，组 FCC 代表着来自 ATPase 和己糖激酶二者的贡献。由于己糖激酶和葡萄糖一般被过量添加，对己糖激酶反应的 FCC 可能是低的，其确实是由 Groen 等（1983）在他们的分析中发现的（见表 11.1）。这样，磷酸化反应组的 FCC 值可能等于 F_0F_1-ATPase 的 FCC 值。

11.5 大偏差理论

代谢控制分析的一个中心规则是弹性和控制系数的定义。实际上，这些量之间的重要的关系（即加和定理和连接定理）是对这些系数定义的直接结果。但重要的是要认识到：MCA 的系数仅仅定义为全导或偏导的形式，这样只能通过系统变量（即浓度、酶活性和通量）的无穷小变化才可直接测量。换一种方法，详细的动力学模型可被用于所需导数的数学计算，因此允许借助于 MCA 理论来计算其余的量。在方框 11.3 中，讨论了一个双重的难题：通过实验来实现一个小的扰动，同时这种小扰动实验又最低限度地被实验误差所变坏。现实上，只有当一个系统变量的变化处于可测量阈之上时（因此，是有限度的），才能通过实验对这种变化进行定量测量。由于扰动越大实验误差就越小，因此显然企图通过大的系统扰动来估计控制系数，当然条件是这样的：计算能提供控制系数的精确的估计。直到最近，还没有可用的方法将有限度的实验结果同 MCA 衍生出的系数联系起来。一组作为对 MCA 理论的扩展延伸而产生的新关系（Small and Kacser，1993a，b），允许离开稳态的大偏差用于的弹性和控制系数的确定。这一节中将详细讨论这些关系及其产生的影响。为了简便起见，从一个没有分支的网络的叙述开始讨论，然后将理论延伸到分支代谢网络。

11.5.1 未分支的网络

如 11.1.1 节所述，当途径中任何特定酶活性被扩增时，通过一条未分支途径的通量将增加。由酶活性提高所达到的通量扩增程度依赖于初始酶活性所施加的控制程度，如初始酶活性处的 FCC 所定义（见图 11.1）。

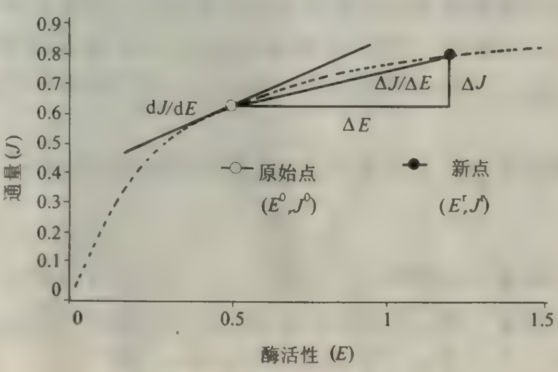


图 11.9 酶活性大偏差的举例

注意到斜率 $\Delta J/\Delta E$ 与原始点处的 dJ/dE 不同，因此用 $\Delta J/\Delta E$ 直接代替 dJ/dE 来计算通量控制系数就会导致不正确的结果

按照一个特定酶的通量控制系数的定义［式（11.2）］，可以从该酶活性的无限小变化，通过确定相应稳态条件下的通量-酶活性关系曲线（图 11.1）的切线斜率来得到 FCCs。显然酶在低酶活性时强烈地影响通量；这通过较大的 FCC 来反映。但在较高酶活性下，酶对通量几乎没有影

响，导致较小的 FCC。应该注意的是：FCC 的不同数值是在不同酶活性下得到的，因为斜率是在如图 11.1 所示的通量-酶活性关系曲线的不同部位测量的。

另一方面，酶活性的有限变化将只能近似于初始稳态点通量-酶活性曲线的斜率，导致不精确的 FCC 值。考虑如图 11.9 所示的酶活性发生大变化的影响。显然，这个大变化的斜率（以 $\Delta J/\Delta E$ 度量），不能严格近似原始点处的 $\mathrm{d}J/\mathrm{d}E$。因此，需要一种方法促进从有限扰动实验中来确定真实的 FCC 值。通过运用 Small 和 Kacser 的大偏差理论，解决了这个看似不和谐的问题。

大偏差理论的基础

充分描述一个任意的通量-酶活性之间的关系是不可能的，因为其一般非常复杂，并且高度非线性。然而，顶替定义最简单的系统是有益的，该系统产生如图 11.1 描述的所期望的通量-酶活性关系。因此 Small 和 Kacser（1993a）简化了计算反应速率 v 的标准公式。该反应是一个可逆的将 X_i 转化为 X_j 的单分子酶催化反应，它的速率 v 的计算如下式：

$$v = \frac{\frac{Ek_{\mathrm{cat}}}{K_{\mathrm{m}_i}}\left(c_i - \frac{c_i}{K}\right)}{1 + \frac{c_i}{K_{\mathrm{m}_i}} + \frac{c_i}{K_{\mathrm{m}_j}}} \tag{11.70}$$

上述作者将上式简化成一个近似形式，其对于酶活性成线性关系：

$$v = e\left(c_i - \frac{c_i}{K}\right) \tag{11.71}$$

其中

$$e = \frac{Ek_{\mathrm{cat}}}{K_{\mathrm{m}_i}k_{\mathrm{s}}} = \frac{v_{\max}}{K_{\mathrm{m}_i}k_{\mathrm{s}}} \tag{11.72}$$

式中

$$k_{\mathrm{s}} = 1 + \frac{c_i}{K_{\mathrm{m}_i}} + \frac{c_i}{K_{\mathrm{m}_j}} \approx 常数 \tag{11.73}$$

式（11.73）中 k_{cat}是米氏机理中产物生成步骤的反应速率常数，带下标（指 i，j）的参数 K_{m} 是酶-底物复合物的生成-解离反应的平衡常数。在下列条件下，饱和函数 k_{s} 是常数：(a) 当 $k_{\mathrm{s}} \approx 1$ 时，$c_i \ll K_{\mathrm{m}_i}$，$c_j \ll K_{\mathrm{m}_j}$；或（b）当由于所观察的酶活性变化时，不存在酶的饱和度相应于其底物的显著变化。通过大偏差理论对为数众多的系统的应用，这种简化凭经验表明，在广泛范围的条件下都是有效的（Small and Kacser，1993a，b）。如果式（11.71）中的常数被进一步组合，显然这种形式等价于一个可逆的一级反应：

$$v = kc_i - k_{-1}c_j \tag{11.74}$$

现在考虑一个将 X_0 转变为 X_n 的线性代谢途径：

$$X_0 \overset{e_1}{\longleftrightarrow} X_1 \overset{e_2}{\longleftrightarrow} X_2 \overset{e_3}{\longleftrightarrow} X_3 \cdots X_{n-1} \overset{e_n}{\longleftrightarrow} X_n \tag{11.75}$$

并假定在此串联反应步骤中每一步的反应速率由类似于式（11.71）的方程来表示，其中酶活性和由酶 i 所催化的反应的平衡常数分别为 e_i 和 K_i，可以表明，通过这样一条途径的通量 J 等于下式（Kacser and Burns，1997）：

$$J = \frac{c_0 - \frac{c_n}{K_{1:n}}}{\frac{1}{e_1} + \frac{1}{e_2K_1} + \frac{1}{e_3K_{1:2}} + \cdots + \frac{1}{e_nK_{1:n}}} \tag{11.76}$$

其中

$$K_{1:n} = \prod_{i=1}^{n} K_i \tag{11.77}$$

注意，对于任意酶活性来说，这个通量表达式都是非线性的。实际上，式（11.76）可被重新整理为任意酶活性 E_i 的函数，产生一个一般的双曲线关系式：

$$J = \frac{E_i \chi_1}{1 + E_i \chi_2} \tag{11.78}$$

上式中的χ_1和χ_2对于每种酶来说是不同的，但总是仅仅包含具有动力学常数形式的常数和固定的外部浓度。还要注意，如果所有其它酶的活性保持不变，式（11.78）毫不意外会产生一个像图 11.1 所示那样形状的通量-酶活性关系曲线，这证实了简化的动力学表达式（11.71）确实符合其基本的准则。

通量控制系数估计式的推导

回想发展一个大偏差理论的目的是将浓度和通量的有限变化与 MCA 的无限小基准相关联。记住这一点，我们将一般的通量-酶活性表达式（11.78）运用到 FCC 的定义式（11.2）中以得到下面的相应于酶活性的通量 J 的控制系数方程式：

$$C_i^J = \frac{1}{1 + E_i^0 \chi_2} \tag{11.79}$$

其中，E_i^0 是初始稳态的酶活性。

现在让 E_i^r 表示扰动后的稳态的酶活性，其以一个因子 r 跟随初始酶活性 E_i^0 的变化，以致 $E_i^r = rE_i^0$，且 J^0 和 J^r 分别表示初始通量和扰动后的通量。因为从图 11.9 中可以明显看出一个有限变化的斜率不能替代式（11.2）通量控制系数计算中的导数部分，因此必须寻找一个使用 $\Delta J / \Delta E$ 的新的表达式。为了计算 $\Delta J / \Delta E$，从原始通量：

$$J^0 = \frac{E_i^0 \chi_1}{1 + E_i^0 \chi_2} \tag{11.80}$$

转变到其扰动后的状态，通量 J^r：

$$J^r = \frac{rE_i^0 \chi_1}{1 + rE_i^0 \chi_2} \tag{11.81}$$

以获得图 11.9 中大偏差的斜率：

$$\frac{\Delta J}{\Delta E} = \frac{J^r - J^0}{E_i^r - E^0} = \frac{\chi_1}{(1 + rE_i^0 \chi_2)(1 + E_i^0 \chi_2)} \tag{11.82}$$

通过与式（11.79）比较，清楚看出，如果用扰动后的通量和酶活性的值对上述差分进行归一化（同初始态相对比）：

$$\frac{E_i^r}{J^r} = \frac{1 + rE_i^0 \chi_2}{\chi_1} \tag{11.83}$$

它们将产生一个归一化的斜率的表达式，虽然这个表达式是从有限差分中导出的，但其等同于真实的通量控制系数：

$$D_i^J \equiv \frac{\Delta J}{\Delta E} \times \frac{E_i^r}{J^r} = \frac{1}{1 + E_i^0 \chi_2} = C_i^J \tag{11.84}$$

为了与通量控制系数相区别，Small 和 Kacser（1993a）将新系数 D_i^J 称为偏差指数。虽然如

此，式（11.84）表明：对于任何满足上述所讨论条件的非分支途径来说，偏差指数都提供了对它的相应通量控制系数的一个非常接近的估计。更重要的是认识到：即使在 FCC 的定义表达式（11.2）中用的是初始值，但在式（11.84）的斜率归一化中用扰动后的值也是完全正确的。这就允许用图 11.9 所示的通量-酶活性关系曲线的两个斜率中的任何一个都能精确确定通量控制系数。

应该注意偏差指数的一些重要的性质。第一，式（11.84）中的偏差指数同酶活性的变化因子 r 没有任何关系。结果是，从同一稳态的不同程度的变化得出的许多偏差指数中的每一个都应当等于初始稳态的通量控制系数。如果做了不止一个扰动实验，这就提供了一个对 FCC 测定的有效性进行内部检验的便利方法。第二，由于式（11.78）中所示的通量-酶活性的双曲型关系对一条途径完全是通用的，因此式（11.84）的结果可以应用于该途径的任何一个酶（当然每个都有自己的参数χ_2）。第三，一条线性途径中所有酶的偏差指数之和应为 1，这如同通量控制系数一样。在一个反应组中一组酶的偏差指数的部分和应类似地等于这组酶的组偏差指数。第四，当有限小的变化 $\Delta J/\Delta E$ 接近于无限小的变化时，偏差指数的定义就与通量控制系数的定义趋于一致，当初值和终值在物理上和数学上不可区分时，斜率就接近 $\mathrm{d}J/\mathrm{d}E$ 了。

【例11.4】 从大偏差确定通量控制系数

Salter 等（1986）研究的鼠肝脏细胞中的色氨酸代谢是 Small 和 Kacser（1993a）在介绍大偏差理论时所用到的一个例子。这个代谢被认为由两步组成：细胞吸收色氨酸和色氨酸 2,3-加双氧酶分解色氨酸。通过激素诱导，色氨酸 2,3-加双氧酶的活性（$v_{\max}$）从基准态的 $13.7\mu\mathrm{mol}\cdot\mathrm{g}^{-1}$（干重）$\cdot\mathrm{h}^{-1}$升至 $101\mu\mathrm{mol}\cdot\mathrm{g}^{-1}$（干重）$\cdot\mathrm{h}^{-1}$。这条途径在诱导条件下的通量由基准态的 $2.6\mu\mathrm{mol}\cdot\mathrm{g}^{-1}$（干重）$\cdot\mathrm{h}^{-1}$升至 $7.8\mu\mathrm{mol}\cdot\mathrm{g}^{-1}$（干重）$\cdot\mathrm{h}^{-1}$。研究者们想知道是运输步骤还是降解步骤是控制通过基准态通量的主要因素，并想估计出每一步的通量控制系数。

依据式（11.84），这条途径中相应于色氨酸 2,3-加双氧酶的通量控制系数等于它的偏差指数。这个数值很容易从所提供的酶活性和通量测量来确定：

$$C^J_{\mathrm{TD}} = D^J_{\mathrm{TD}} = \frac{\Delta J}{\Delta E} \times \frac{E^r_{\mathrm{TD}}}{J^r} = \frac{7.8 - 2.6}{101 - 13.7} \times \frac{101}{7.8} = 0.77$$

根据加和定理，对这两个酶的通量控制系数之和必为 1，因此运输步骤的 FCC 为 0.23。显然，在基准态时降解酶是主要的控制步骤（Salter 等也得到了同样的结论。然而，如果不是得益于大偏差理论，必须做出七个不同的酶活性-通量关系图，然后根据曲线切线的斜率来估计 FCC）。

有趣的是，这些数据也解答了另外一个问题，即在诱导状态下色氨酸 2,3-加双氧酶的活性仍然是控制因素吗？通过交换在先前的计算中用到的基准态和扰动态的定义，就可能确定在诱导状态时的通量控制系数。通过这样做，确定了在诱导状态下色氨酸 2,3-加双氧酶的 FCC 实际上是 0.31，运输步骤的 FCC 是 0.69，表明在诱导状态下色氨酸的吸收是途径通量的主要限制。

预测通量的变化

在上一节中，证明了对由酶活性变化引起的通量变化的测量能用于估计通量控制系数。反过来，如果给出了合适的 FCCs 值，这个理论也提供了对由一个酶活性的特定变化而产生

的新的通量进行估计的方法。在构筑一个详尽的基因工程计划之前，这样的计算在确定潜在的遗传改变的效果时是有的。简单地说，这种估算只需要对式（11.84）进行重排：

$$\frac{\Delta J}{J^r} = C_i^J \frac{\Delta E}{E_i^J} \tag{11.85}$$

式（11.85）的无因次表述证明对通量的估计是更方便的。上式要求引入两个扩增因子的定义来表征每一个通量变化和酶活性变化。酶活性扩增因子（AAF）r_i 描述了酶活性 E_i 变化的程度。

$$r_i = \frac{E_i^r}{E_i^0} \tag{11.86}$$

通量扩增因子（FAF）f 是扰动后的通量与初始通量的比值。

$$f = \frac{J^r}{J^0} \tag{11.87}$$

通过引入这两个无因次的因子之后，式（11.85）可以整理为下面的形式，以便从初始通量和通量扩增因子来确定新的稳态下的预期通量值：

$$f = \frac{1}{1 - C_i^J\left(\frac{r_i - 1}{r_i}\right)} \tag{11.88}$$

上式可以整理成如下的对称形式：

$$\frac{f-1}{f} = C_i^J\left(\frac{r_i - 1}{r_i}\right) \tag{11.89}$$

至此，只考虑了单个酶的扩增。大偏差理论也适用于多个酶的活性发生变化的情况（Small and Kacser，1993a）。在这种情况下，不同的活性扩增因子将被应用于途径中 n 个酶中的每一个酶，而且通量的变化可从下式中求出：

$$\frac{f-1}{f} = \sum_{i=1}^{n}\left[C_i^J\left(\frac{r_i - 1}{r_i}\right)\right] \tag{11.90}$$

记住，式（11.90）对于 n 个酶中的每一个使用了不同的 FCC 和 AAF。虽然加和式也包括了酶活性没有发生变化的酶，但应该注意的是没有发生变化的酶的 r_i 是 1，加和式中多了一项值为零的项。因此，代表单个酶关系的式（11.89）只是更为通用的式（11.90）的一个特例。此时式（11.90）中的加和式只有一项不为零，其余的 $n-1$ 项都为零。

【例 11.5】 由酶活性变化引起的通量变化的估计

Salter 等（1986）在他们对鼠肝脏细胞中色氨酸代谢的探索研究中测量了色氨酸 2,3-加双氧酶的几种浓度水平（超出例 11.4 所讨论的）时的影响。有两个实验测得酶活性（v_{max}）分别是 30μmol·g⁻¹（干重）·h⁻¹和 58μmol·g⁻¹（干重）·h⁻¹，与其对应的通量分别是（4.6±0.35）μmol·g⁻¹(干重)·h⁻¹和（6.7±0.35）μmol·g⁻¹(干重)·h⁻¹。如果基准态的通量是 2.6μmol·g⁻¹(干重)·h⁻¹，则测得色氨酸 2,3-加双氧酶的酶活性为 13.7μmol·g⁻¹(干重)·h⁻¹，FCC 为 0.77。那么，这两个实验的结果同大偏差理论的预测相一致吗？

对这两个实验的第一个来说，酶活性扩增因子是 30/13.7 或 2.19。用式（11.88）计算出的该实验的通量扩增因子是：

$$f = \frac{1}{1 - C_{\mathrm{TD}}^J\left(\frac{r_{\mathrm{TD}} - 1}{r_{\mathrm{TD}}}\right)} = \frac{1}{1 - 0.77 \times \left(\frac{2.19 - 1}{2.19}\right)} = 1.72$$

将基准态通量乘以通量扩增因子后，该实验预测的通量是 4.47μmol·g^{-1}(干重)·h^{-1}。同样得出第二个实验的预测的通量为 6.31μmol·g^{-1}(干重)·h^{-1}。由于这两个预测结果没有一个远离通量测量的标准偏差，因此应当得出结论：这些结果是一致的。可以得出实验的结果同大偏差理论的预测相一致的结论。

11.5.2 分支网络

代谢网络一般包括不同的分支点，在分支点处，一种物质 S 与可以被两条不同的途径所利用，如图 11.10 所示。实际上，几乎任何网络结构都可以通过在特定的分支点处将不同的未分支途径进行连接来构建，通常构成许多分支互相编织的复杂体。此外，一些网络可能包括收敛性的分支点（convergent branch points），在此处 S 由两条途径所产生而被一条途径所利用。由于在式（11.71）所做的线性动力学的简化假定，所以用大扰动理论来对一个分支点进行数学处理在功能上同前述的这些情况中的任何一种都是等价的。

就像线性途径的情况一样，在分支网络的表达式中，大偏差理论假定了式（11.71）那样的线性化的形式。因此，每个分支途径都能用一个一级可逆的动力学表达式：

$$v_A = E_A\left(c_A - \frac{c_S}{K_A}\right)$$
$$v_B = E_B\left(c_S - \frac{c_B}{K_B}\right) \qquad (11.91)$$
$$v_C = E_C\left(c_S - \frac{c_C}{K_A}\right)$$

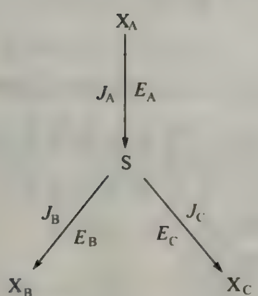


图 11.10 一个简单的分支网络举例
每一个分支途径由一个简单的步骤、一系列未分支步骤或一簇子分支所组成。每一个分支途径在数学上表示一个单个虚拟反应。这个反应具有式(11.71)所示的线性化的动力学形式，催化这个反应的酶的活性为 E_i，通过这个反应的通量为 J_i

作为这些线性化的速率表达式的结果，图 11.10 中任何分支途径的动力学都将具有式（11.91）所示的形式（即使这些分支是由多个步骤和（或）子分支途径组成）。类似地，通过任何子分支途径的通量也必定具有同样的一般形式。例如：假定分支途径 A 实际上是一条包括在一个简单的未分支途径中的三个反应。如前所表明的，通过这条途径的通量将具有表达式（11.76）所示的形式，其具有如式（11.91）一样的线性化的形式。由于这个通量依赖于外部代谢物 X_A 和分支点代谢物 S 的浓度，它并不代表分支网络中通量的一个解，而是代替地定义由分支途径 A 所代表的虚拟反应的动力学。实际上，这个虚拟的反应代替整个分支途径，把各个单个的动力学常数和浓度组合进式（11.91）中的常数中。由类似的理由，分支途径 B 和 C 也能被表示为图 11.10 所示形式的虚拟反应，具有等价于式（11.91）的动力学。

为了从式（11.91）的动力学确定稳态通量，有必要借助于围绕分支点代谢物 S 的平衡式：

$$J_A = J_B + J_C \qquad (11.92)$$

如果式（11.89）中的每一个速率 v_i 都被其相应的稳态通量配对物 J_i 所替代，则式（11.91）可代入式（11.92）中，这样就可以以动力学常数和外部浓度的形式来确定中间物 S 的浓度和通过三个分支途径的每一个

的通量。随后 Small 和 Kacser（1993b）用类似于前节所说的方法从这些表达式中推导出偏差指数与通量控制系数之间的关系。由于推导过程相当的冗长，这里就只列出结果。

与未分支途径的分析结果形成对照，这个分析结果显示在一个分支体系中的偏差指数不是必须等于相应的通量控制系数。如果一个酶活性 E_i 提高了 r_i 倍（r_i 是一个因子），则偏离指数对于通量 J_k（以通量控制系数的形式）影响的一般表达式是：

$$D_i^{J_k} \equiv C_i^{J_k} F_i^k \quad i,k \in \{A, B, C\} \tag{11.93}$$

其中

$$F_i^k = \frac{1}{1-(C_i^{J_i}-C_i^{J_k})\dfrac{r_i-1}{r_i}} \quad i,k \in \{A,B,C\} \tag{11.94}$$

这样，偏差系数与其相应的 FCC 不同（相差一个因子 F_i^k），F_i^k 不仅与通量放大因子有关，还同两个通量控制系数有关。然而，注意到如果 $i=k$（即已测定了分支途径的活性的变化对其自身通量的影响时），$F_i^k=1$，此时偏差指数等同于通量控制系数。因此，

$$D_i^{J_i} \equiv C_i^{J_i} \quad i \in \{A, B, C\} \tag{11.95}$$

这个结果不应出人意料，因为分支途径 i 本身可以被想像为一个单个反应步骤或者是一条未分支途径，在此情况下酶活性扰动和通量测量二者都发生在一个单一未分支途径中。因此，只要分支点代谢物 S 不介入被扰动的酶和通量测量点之中，就可以应用 11.5.1 节中所介绍的分析方法。

虽然式（11.93）为我们提供了一种将偏差指数与 FCCs 相联系的一般方法，但这种方法还是有点烦琐。因为偏差指数可以用在式（11.86）和式（11.87）中分别介绍的通量扩增因子和酶活性扩增因子来表示：

$$D_i^{J_k} \equiv \frac{\Delta J_k}{\Delta E_i} \times \frac{E_i^r}{J_k^r} = \frac{f_i^k-1}{r_i-1} \tag{11.96}$$

所以式（11.93）中的偏差指数可以去掉而用式（11.96）来代替。随后进行整理，在相应于分支 i 的一个活性变化的三个 FCCs 之间得到一个简单直观的关系式（Stephanopoulos and Simpson，1997）：

$$K_i = \frac{C_i^{J_A}}{f_i^A-1} = \frac{C_i^{J_B}}{f_i^B-1} = \frac{C_i^{J_C}}{f_i^C-1} \quad i \in \{A,B,C\} \tag{11.97}$$

其中

$$K_i = \frac{r_i}{f_i^i(r_i-1)} \quad i \in \{A,B,C\} \tag{11.98}$$

式（11.97）揭示了分支途径 i 的一个活性变化所引起的通量 J_k 的分数变化，f_i^k-1，其与相应的控制系数 $C_i^{J_k}$ 成比例；此外，同样的比例性也适用于所有三个分支途径中的通量变化。这个比例性被称为扰动常数 K_i，可从受扰动途径的 AAF 和 FAF 来计算。然而，要记住的是，这个常数仅仅反映了在一条分支途径中发生特定扰动的结果，而不同的扰动将产生不同的扰动常数。

预测通量的变化

一旦知道了围绕分支点代谢物的一条或多条途径的通量控制系数，就有可能预测某种扰动对系统所产生的影响。对于单一分支途径 i 的一个变化（用一个酶活性扩增因子 r_i 来表征这种变化），对所有三个分支预期的通量变化可以以 FAFs 的形式来确定（Small and

Kacser，1993b)。

$$f_i^k = \frac{1}{1 - C_i^{J_k}\left(\frac{r_i - 1}{r_i}\right)} \quad k \in \{A,B,C\} \tag{11.99}$$

注意，这个结果在功能上等同于式（11.88)，因此可整理成类似于式（11.89）的一个更对称的形式。

$$\frac{f_i^k - 1}{f_i^k} = C_i^{J_k}\left(\frac{r_i - 1}{r_i}\right) \quad k \in \{A,B,C\} \tag{11.100}$$

最终，给出了这些结果与未分支系统的严格类似，则在多分支途径中（分别由 r_A，r_B 和 r_C 表征）的扰动表达式同式（11.90）严格类似就不令人吃惊了：

$$\frac{f_{ABC}^k - 1}{f_{ABC}^k} = \sum_i C_i^{J_k}\left(\frac{r_i - 1}{r_i}\right) \quad i,k \in \{A,B,C\} \tag{11.101}$$

浓度控制系数和浓度变化

因为分支点代谢物的浓度 S 是在先前的推导过程中确定的，因此就有可能用大偏差理论来确定浓度控制系数和利用浓度控制系数来预测一个特定扰动所引起的浓度变化。此外，由于分支系统和非分支系统之间的类似性，CCCs 可以用这种方式来确定：即不仅对分支点代谢物 S 而且对任何中间代谢物 X_j。对于酶（或分支）的活性 E_i 的一个从 E_i^0 到 E_i^r 的扰动来说，相应于浓度 c_j 变化的 CCC 可以求出

$$C_i^{X_j} = \frac{c_j^r - c_j^0}{E_i^r - E_i^0} \times \frac{E_i^r}{c_j^0} \times \frac{J_i^0}{J_i^r} = \frac{\Delta c_j}{\Delta E_i} \times \frac{E_i^r}{c_j^0} \times \frac{J_i^0}{J_i^r} \tag{11.102}$$

如果将这个表达式同通量控制系数的表达式（11.84）相比较，两个有趣的差别是立即值得注意的：式（11.102）不仅被扰动了的酶活性和初始代谢物浓度所归一化，还进一步被通过改变了的酶反应步骤的扰动了的通量与初始的通量之比所归一化。因此，浓度控制系数的确定不仅需要对浓度和酶活性的变化的测量，还需要对通量变化的确定。然而，如果式（11.102）中变化趋向无限小，该式就变为传统的浓度控制系数的定义式。

为了考虑对由酶活性变化所引起的代谢物浓度的变化的预测，将式（11.102）整理成一个无因次的形式是有用的。为此，引入了一个完全类似于通量扩增因子的一个新量——代谢物扩增因子（MAF）ϕ_i^j 。

$$\phi_i^j \equiv \frac{c_j^r}{c_j^0} \tag{11.103}$$

对于一个单个步骤中的酶活性变化，其可用 r_i 的一个 AAF 来描述，相应于浓度 c_j 变化的 MAF 可用下式来预测：

$$C_i^{X_j}\left(\frac{r_i - 1}{r_i}\right) = (\phi_i^j - 1)\left[1 - C_i^{J_i}\left(\frac{r_i - 1}{r_i}\right)\right] = \frac{\phi_i^j - 1}{f_i} \tag{11.104}$$

正如前面所看到的，单个酶活性的扰动是一种特例。当大偏差理论替代应用于 n 个酶活性改变的情况（Small and Kacser，1993b)，MAF 可用下式来计算：

$$\sum_{i=1}^{n}\left[C_i^{X_j}\left(\frac{r_i - 1}{r_i}\right)\right] = (\phi_i^j - 1)\left\{1 - \sum_{i=1}^{n}\left[C_i^{J_i}\left(\frac{r_i - 1}{r_i}\right)\right]\right\} \tag{11.105}$$

要记住式（11.105）中对于 n 个酶的每一个都使用了不同的 FCC、CCC 和 AAF 值。对于一个分支网络，对所有三个分支（A，B 和 C）进行加和。此外，尽管这个加和包括了酶活

性还没被改变的任何酶，所有这些酶的 r_i 值均为 1，导致仅是数值为零的项的添加。

11.5.3 对营养物浓度和外部效应物变化的响应

除了描述改变酶活性后的影响之外，大偏差理论还能用于描述由于外部营养物和其它效应物浓度变化所引起的通量变化（Small and Kacser，1993a）。任何这样的效应物都被假定是通过诱导一个或多个酶反应速率的变换而起作用，其进而使途径中的稳态通量发生变化。如果诱导的酶反应速率的变化可以知道，那么就可以依据先前介绍的程序来求出酶活性扩增因子（可由此进一步求出通量控制系数）。另一方面，如果并不知道由效应物所引起的速率变化，通量变化就可以通过式（11.7）所示的响应系数的形式来表示。如果用一个效应物弹性来描述对酶 E_k 的动力学影响，响应系数就可以通过式（11.12）来表示。如果假定正被扰动的效应物 X_0 是一条未分支途径的外部底物，则初始通量可以用下式来表示：

$$J^0 = \frac{E_1^0\left(c_0 - \frac{c_n}{K_{1:n}}\right)}{1 + E_1^0\chi_2} \tag{11.106}$$

而扰动后的通量可用下式表示

$$J^x = \frac{E_1^0\left(x_0c_0 - \frac{c_n}{K_{1:n}}\right)}{1 + E_1^0\chi_2} \tag{11.107}$$

式中，x_0 是效应物 X_0 的浓度 c_0 的变化因子（或效应物扩增因子）。将式（11.106）代入响应系数的定义式中得到下式：

$$R_{X_0}^J = \frac{c_0}{c_0 - \frac{c_n}{K_{1:n}}} \tag{11.108}$$

为了将这个结果同 c_0 的大扰动相联系，由式（11.106）和式（11.107）确定了如下比值：

$$\frac{\Delta J}{\Delta c_0} = \frac{J^x - J^0}{x_0c_0 - c_0} = \frac{E_1^0}{1 + E_1^0\chi_2} \tag{11.109}$$

比较式（11.108）和式（11.109），很明显后者用 c_0/J^0 归一化后，就可确定响应系数：

$$R_{X_0}^J = \frac{\Delta J}{\Delta c_0} \times \frac{c_0}{J^0} \tag{11.110}$$

此外，一旦对已改变后的酶的通量控制系数和反应系数都可知道，就可以从式（11.105）中求出效应物弹性。并且，由效应物浓度变化导致的通量变化可以通过下式来预测：

$$f_j^i - 1 = \frac{J_i^x - J_i^0}{J_i^0} = R_{X_j}^J(x_j - 1) \tag{11.111}$$

虽然在这个论证过程中用的是初始底物的浓度变化，但是式（11.110）对任何外部底物或产物的浓度变化都是通用的（这种变化除了通过酶活性外不影响酶动力学）。如果一个效应物通过改变酶的浓度、催化活性或它与底物/产物的亲和性来对酶活性产生直接的影响，利用适当的动力学影响来代替式（11.107），本节的分析就可替代重复。Small 和 Kacser（1993a）推导出几种这样的情况的一些结果。

11.5.4 讨论

大偏差理论是一种强有力的工具，它将代谢控制分析的无限小的限制扩展到实验的可测量领域。尽管如此，涉及该理论的衍生结果的一些最后的评论注释依次如下。

第一，应该强调：前面的公式是用一个简化的一级动力学近似式推导出来的。所以，用

这些公式来分析一个具有高度非线性特点的系统就可能导致可疑的结果。Small and Kacser（1993b）在证明其工作合理性的过程中，用了几个非线性模型来检验他们的分析结果的一致性，结果表明这种一致性很好。尽管这样，一致性检验的需要也不能被过分强调。对于所研究的酶，通过用两个或更多个不同的酶活性扩增水平来重复一个 FCC 计算就常可简单地进行这种一致性检验。而且，很容易确定由测量的不确定性所造成的对 FCC 计算的误差（Small and Kacser，1993b）。

第二，虽然用这个理论所推导出的方程在表面上都很简单，但是它们并不具有直观性。例如，在扩增或减弱酶活性所造成的影响中存在着一些出人意料的结果。由于图 11.9 中通量-酶活性关系曲线的形状，酶活性非常小的降低都会有重大的影响，而很大的酶活性增加可能被需要以便产生可测量的通量变化。实际上，酶活性降为零等于废弃一条未分支途径。另一方面，酶活性增大时将只是缓慢地达到其最大通量的边界线。

第三，即最后一点，了解这个理论适用性的限制性是很关键的。例如，预期将任何酶活性降为零都可导致对应于该酶的 FCC 为正值的那些通量降为零。尽管如此，如果所减弱的酶处于一个分支途径的分支 B，只要分支 C 的酶保持一些活性，通过分支 A 的通量将不会被降低到零。这些方程也能预测通过不可逆反应的负浓度或负通量。

因此必须像分析任何其它的理论一样，要用有辨别力的眼光来分析从大偏差理论中得出的结论。常识应该能帮助我们辨别什么时候由于实验误差或非线性原因，通量控制系数是不可靠的。另外，下一章将更深入地讨论网络的稳定性的一些问题，这将帮助我们避免在预测上产生明显的不一致性。在下一章还将介绍一种适用于更一般情况的分支途径，甚至是更复杂的网络中的通过多种扰动来确定通量控制系数的方法。

参 考 文 献

Atkinson, D.E. (1990). What should a theory of metabolic control offer to the experimenter? "*Control of Metabolic Processes*," NATO ASI Series A Vol. 190, pp.3-27. Edited by A. Cornish-Bowden and M.L.Cardenas. New York: Plenum Press.

Bainbridge, Z.A., Scott, R.I., & Perry, D. (1992). Oxygen utilization by isopenicillin N synthase from *Penicillium chrysogenum*. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* **55**; 233-238.

Brand, M.D., Hafner, R.P., & Brown, G.C (1988). Control of respiration in non-phosphorylating mitochondria is shared between the proton leak and the respiratory chain. *Biochemical Journal* **255**: 535-539.

Brown, C., Hafner, P.P., & Brand, M.D. (1990a). A "top-down" approach to determination of control coefficients in metabolic control theory. *European Journal of Biochemistry* **188**; 321-325.

Brown, G.C., Lakin-Thomas, P.L., & Brand, M.D. (1990b). Control of respiration and oxidative phosphorylation in isolated rat liver cells. *European Journal of Biochemistry* **192**; 355-362.

Cornish-Bowden, A. (1989). Metabolic control theory and biochemical systems theory: Different objectives, different assumptions, different results. *Journal of Theoretical Biology* **136**; 365-377.

Crabtree, B., & Newsholme, E.A. (1987a). A systematic approach to describing and analyzing metabolic control systems. *Trends in Biochemical Science* **12**; 4-12.

Crabtree, B., & Newsholme, E. A. (1987b). The derivation and interpretation of control coefficients. *Biochemical Journal* **247**; 113-120.

Delgado, J., & Liao, J.C. (1991). Identifying rate-controlling enzymes in metabolic pathways without kinetic parameters. *Biotechnology Progress* **7**; 15-20.

Delgado, J., & Liao, J.C (1992a). Determination of flux control coefficients from transient metabolite concentrations. *Biochemical Journal* **282**; 919-927.

Delgado, J., & Liao, J.C. (1992b). Metabolic control analysis using transient metabolite concentrations. Determination of metabolite concentration control coefficients. *Biochemical Journal* **285**: 965-972.

Delgado, J., Meruane, J., & Liao, J.C (1993). Experimental determination of flux control distribution in biochemical systems: *In vitro* model to analyze transient metabolite concentrations. *Biotechnology and Bioengineering* **41**; 1121-1128.

Discussion Forum. (1987). *Trends in Biochemical Science* **12**; 216-224.

Ehlde, M. (1995). Dynamic and steady state models of metabolic pathways. A theoretical evaluation. Ph.D. thesis, University of Lund, Sweden.

Ehlde, M., & Zacchi, G. (1997). A general formalism for Metabolic control analysis. *Chemical Engineering Science* **52**; 2599-2606.

Ehlde, M., & Zacchi, G. (1996). Influence of experimental errors on the determination of flux control coefficients from transient metabolite measurements. *Biochemical Journal* **313**; 721-727.

Fell, D. A. (1992). Metabolic control analysis: a survey of its theoretical and experimental development. *Biochemical Journal* **286**; 313-330.

Fell, D.A. (1985). Metabolic control and its analysis. Additional relationships between elasticities and control coefficients. *Biochemical Journal* **269**; 255-259.

Flint, H.J., Tateson R.W., Barthelmess, I.B., Porteous, D.J., Donachie, W.D, & Kacser, H. (1981). Control of flux in the arginine pathway of *Neurospora crassa*. *Biochemical Journal* **200**: 231-246.

Galazzo, J.L., & Bailey, J.E. (1990). Fermentation pathway kinetics and metabolic flux control in suspended and immobilized *Saccharomyces cerevisiae*. *Enzyme and Microbial Technology* **12**; 162-172.

Groen, A.K., Wanders, R.J.A., Westerhoff, H.V., vnd der Meer, R., & Tager, J.M. (1982). Quantification of the contribution of various steps to the control of mitochondrial respiration. *Journal of Biological Chemistry* **257**; 2754-2757.

Groen, A.K., Vervoorn, R.C., Van der Meer, R., & Tagger, J.M. (1983). Control of rat liver glyconeogenesis in rat liver cells. I. Kinetics of the individual enzymes and the effect of glucagon. *Journal of Biological Chemistry* **258**; 14346-14353.

Groen, A.K., van Roermund, C.W.T., Vervoorn, R.C., & Tager, J.M. (1986). Control of gluconeogenesis in rat liver cells. Flux control coefficients of the enzymes in the gluconeogenic pathway in the absence and presence of glucagon. *Biochemical Journal* **237**; 379-389.

Hafner, R.P., Brown, G.C., & Brand, M.D. (1990). Analysis of the control of respiration rate, phosphorylation rate, proton leak rate and protonmotive force in isolated mitochondria using the "top-down" approach of Metabolic control analysis. *European Journal of Biochemistry* **188**: 313-319.

Heinrich, R., & Rapoport, T.A. (1974). A linear steady state treatment of enzymatic chains. General properties, control and effector strength. *European Journal of Biochemistry* **42**; 89-95.

Heinrich, R., Rapoport, S.M., & Rapoport, T.A. (1977). Metabolic regulation and mathematical models. *Progress in Biophysics and Molecular Biology* **32**; 1-82.

Henriksen, C.M., Nielsen, J., & Villadsen, J. (1997). Influence of dissolved oxygen concentration on the penicillin biosynthetic pathway in steady state cultures of *Penicillium chrysogenum*. *Biotechnology Progress* **13**: 776-782.

Higgins, J. (1963). Analysis of sequential reactions. *Annals of the New York Academy of Science* **108**; 305-321.

Higgins, J. (1965). Dynamics and control in cellular reactions. "*Control of Energy Metabolism*," pp.13-36. Edited by B. Chance, R.W. Estabrook, and J.R. Williamson. New York: Academic Press.

Kacser, H. (1983). The control of enzyme systems *in vivo*: Elasticity analysis of the steady state. *Biochemical Society Transactions* **11**; 35-43.

Kacser, H. (1991). A superior theory? *Journal of Theoretical Biology* **149**; 141-144.

Kacser, H. & Burns, J.A. (1973). The control of flux. *Symposia of the Society for Experimental Biology* **27**; 65-104.

Kacser, H. & Burns, J.A. (1979). Molecular democracy: Who shares the controls? *Biochemical Society Transactions* **7**; 1149-1160.

Kacser, H., Sauro, H.M., & Acerenza, L. (1990). Enzyme-enzyme interactions and control analysis. 1. The case of non-additivity: monomer-oligomer associations. *European Journal of Biochemistry* **187**; 481-491.

Liao, J.C., & Delgado, J. (1993). Advances in Metabolic control analysis. *Biotechnology Progress* **9**; 221-233.

Niederberger, P., Prasad. R., Miozzari, G., & Kacser, H. (1992). A strategy for increasing an *in vivo* flux by genetic manipulations. The tryptophan system of yeast. *Biochemical Journal* **287**; 473-479.

Nielsen, J. (1997). *Physiological engineering aspects of* Penicillium chrysogenum. Singapore: World Scientific.

Nielsen, J., & Jфrgensen, H.S. (1995). Metabolic control analysis of the penicillin biosynthetic pathway in a high yield-

ing strain of *Penicillium chrysogenum*. *Biotechnology Progress* **11**; 299-305.

Pettersson, G. (1996). Errors associated with experimental determinations of enzyme flux control coefficients. *Journal of Theoretical Biology* **179**; 191-197.

Pissarra, P.de N.; Nielsen, J.; & Bazin, M.J. (1996). Pathway kinetics and metabolic control analysis of a high-yielding strain of *Penicillium chrysogenum* during fed-batch cultivations. *Biotechnology and Bioengineering* **51**; 168-176.

Ramos, F.R., López-Nieto, M.J., & Martín, J.F. (1985). Isopenicillin N synthetase of *Penicillium chrysogenum*, an enzyme that converts δ-(L-α-aminoadipyl)-L-cysteinyl-D-valine to isopenicillin N. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **27**; 380-387.

Reder, C. (1988). Metabolic control theory: a structural approach. *Journal of Theoretical Biology* **135**; 175-201.

Ruyter, G.J.G., Postma, P.W., & van Dam, K. (1991). Control of glucose metabolism by enzyme II^{Glc} of the phosphoenolpyruvate-dependent phosphotransferase system in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology* **173**; 6184-6191.

Salter, M., Knowles, R.G., & Pogson, C. (1986). Quantification of the importance of individual steps in the control of aromatic amino acid metabolism. *Biochemical Journal* **234**; 635-647.

Savageau, M.A. (1969a). Biochemical systems analysis. I. Some mathematical properties of the rate law for the component enzymatic reactions. *Journal of Theoretical Biology* **25**; 365-369.

Savageau, M.A. (1969b). Biochemical systems analysis. II. The steady state solutions for an *n*-pool system using a power-law approximation. *Journal of Theoretical Biology* **25**; 370-379.

Savageau, M.A. (1970). Biochemical systems analysis. III. Dynamic solutions using a power-law approximation. *Journal of Theoretical Biology* **26**; 215-226.

Savageau, M.A., Voit, E.O., & Irvine, D.H. (1987a). Biochemical systems theory and metabolic control theory: 1. Fundamental similarities and differences. *Mathematical Biosciences* **86**; 127-145.

Savageau, M.A., Voit, E.O., & Irvine, D.H. (1987b). Biochemical systems theory and metabolic control theory: 2. The role of summation and connectivity relationships. *Mathematical Biosciences* **86**; 147-169.

Small, J.R. (1993). Flux control coefficients determined by inhibitor titration. The design and analysis of experiments to minimize errors. *Biochemical Journal* **296**; 423-433.

Small, J.R. & Kacser, H. (1993a). Responses of metabolic systems to large changes in enzyme activities and effectors. I. The linear treatment of unbranched chains. *European Journal of Biochemistry* **213**; 613-624.

Small, J.R. & Kacser, H. (1993b). Responses of metabolic systems to large changes in enzyme activities and effectors. II. The linear treatment of branched pathways and metabolite concentrations. Assessment of the general nonlinear case. *European Journal of Biochemistry* **213**; 625-640.

Stephanopoulos, G. & Simpson, T.W. (1997). Flux amplification in complex metabolic networks. *Chemical Engineering Science* **52**; 2607-2628.

Theilgaard, H.B.A., Henriksen, C.M., Kristiansen, K., & Nielsen, J. (1997). Purification and characterization of δ-(L-α-aminoadipyl)-L-cysteinyl-D-valine synthetase (ACVS) from *Penicillium chrysogenum*. *Biochemical Journal* **327**; 185-191.

Torres, N. V., Mateo, F., Melendez-Hevia. E., & Kacser, H. (1986). Kinetics of metabolic pathways. A system *in vitro* to study the control of flux. *Biochemical Journal* **234**; 169-174.

Torres, N. V., Sicilia, J., & Melendez-Hevia, E. (1991). Analysis and characterization of transition states in metabolic systems. Transition times and the passivity of the output flux. *Biochemical Journal* **276**; 231-236.

Voet, D. & Voet, J. G., editors (1995). Biochemistry 2. New York: John Wiley & Sons.

Walter, R., Morris, J., & Kell, D. (1987). The roles of osmotic stress and water activity in the inhibition of the growth, glycolysis and glucose phosphotransferase system of *Clostridium pasteuranum*. *Journal of General Microbiology* **133**; 259-266.

Westerhoff, H.V., Groen, A. K., & Wanders, R.J.A. (1984). Modern theories of metabolic control and their application. *Bioscience Reports* **4**; 1-22.

第 12 章　代谢网络的结构分析

在上一章中，论述了代谢控制分析的基本概念及其关键参数确定的方法。注意到，MCA 以控制系数的形式提供了由代谢网络中每个反应步骤对每一个网络通量和代谢物所施加的控制程度。实际上，控制系数提供了对由一个特定反应的扰动所产生影响的表征，以便能够预测同一反应步骤的其它扰动所产生的影响。在第 11 章中所介绍的方法可允许依据通量的估测来确定控制系数和其它的 MCA 参数，甚至是在代谢网络的动力学发生了强烈扰动的情况下也能这样做。基于代谢物平衡、反应计量学和同位素标记，在第 8 章至第 10 章提供了对这些计算所需通量估计的一个综合性方法。

在本章中，将转向更具挑战性的任务：分析比在第 11 章讨论的简单的未分支或分支途径更复杂的代谢网络中的通量控制。一个复杂代谢网络的定义为：一个含有许多酶反应的系统，这些反应产生和消耗代谢物，并通过共同的前体物、产物或效应物来相互影响。这样的网络通过一系列反应对外部底物进行加工，这些反应最终产生一种或多种所希望的产物，往往还要与不需要的副产物反应竞争。在本章和下一章中，将以芳香族氨基酸的生物合成途径（见图 12.1）作为实例来进行研究。利用网络反应动力学模型（Stephanopoulos and Simpson，1997），将举例说明这些方法，它们能对这个系统或任何类似的复杂系统的控制结构给出实验的阐明。

本章和下一章的目的是提供一般的和系统的方法来用于以下的目的：

- 基于系统的化学计量学，以可辨认的分支点的形式来定义一个网络的本征结构；
- 根据 MCA 参数来分析复杂代谢网络的动力学特性；
- 识别关键反应和分支点；
- 通过增强或减弱关键反应来对目的通量的扩增进行优化。

本书将首先对每个方法提供一个一般描述，接下去用实例研究进行举例说明，该实例是面包酵母中芳香族氨基酸生物合成途径的动力学模型。要记住的是，基于 Galazzo 和 Bailey（1990，1991）的工作所提出的这种模型仅仅是一个为了举例目的而用的代表细胞，本书并不打算精确地描绘面包酵母（*Saccharomyces cerevisiae*）的功能活动。因此，在本章中获得的结论可能适用于或可能不适用于实际的生产菌株。这里的目的不是对生物实体进行模拟，而宁可说是利用一个系统，该系统展示代表实际生物系统的调节机制、严密控制机制和反馈机制的许多方面，为分析这样的系统探索各种不同的方法。从代表性细胞的分析所获得的经验教训可以形成对实际生物体系进行系统实验研究的基础。

由于存在分支是复杂系统所共有的最简单的特征，因此对复杂系统的讨论从分支代谢途径研究开始。由于每一个分支点的存在都增加了一个网络的复杂程度，因此如下两点很重要：(a) 确定整个网络通量控制中的重要分支点，(b) 理解在分支点处的通量控制分布并提供测量这种控制的综合性方法。

在上述的介绍之后，下面将完全集中在分析复杂网络的方法上来。对于大的生物合成网络来说，要想确定每一个单个反应对通量的影响是不切实际的，认识到这一点是很重要的。一个更有效的方法是将反应分组并研究每一个反应组对整个代谢途径通量控制的影响。这也

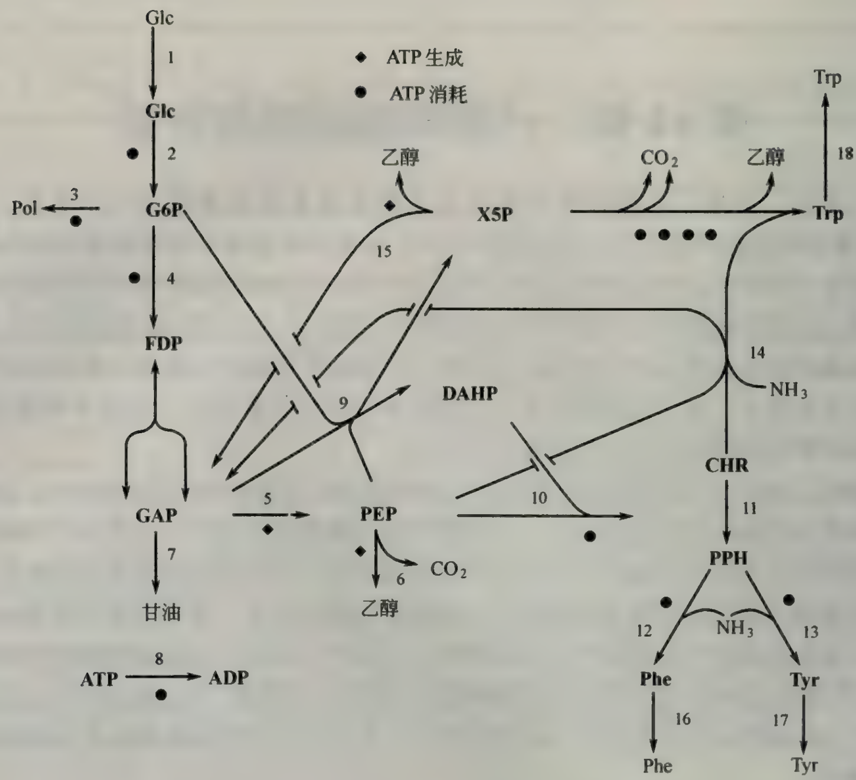


图 12.1 芳香族氨基酸的生物合成网络

在 *Saccharomyces cerevisiae* 中参与芳香族氨基酸的生物合成的关键反应包括自由能的生成。处于稳态的内部代谢物（见 12.2.2 节）用大字体表示。各反应（用数字代表）可以包括一个或多个协调的酶催化步骤。将 FDP 变为 GAP 的反应接近平衡，其净反应速率和反应 4 的净速率一样。缩写符号的意义如下：CHR—分支酸；DAHP—3-脱氧-D-阿拉伯型庚酮糖酸-7-磷酸；FDP—1,6-二磷酸果糖；G6P—6-磷酸-葡萄糖；GAP—3-磷酸甘油醛；Glc—葡萄糖；PEP—磷酸烯醇丙酮酸；Phe—苯丙氨酸；PPH—预苯酸；Pol—多糖；Trp—色氨酸；Tyr—酪氨酸

是前面提及的自上而下法的实质。这一章为将自上而下法应用到真实网络中提供了一种系统的程序步骤。虽然总体构思相当简单，但执行步骤可能变得很复杂。因此对单个步骤有关的过程的目的保持一个清晰的认识是很重要的，简述如下。

（1）第一步是建立对反应和途径进行分组的规则。这对简单的反应体系是直截了当的，但是随着网络的大小和复杂性的增加，就变得不那么清楚了。在 12.2 节中，提供系统地对反应进行分组和识别网络中关键分支点的方法论。在 12.3 节中用氨基酸实例示范证明进行反应分组的方法。

（2）组通量控制系数（gFCCs）为我们提供了一组反应对途径通量影响的一种度量标准。在下一章的第 2 节（13.2）中介绍基于每一组中的战略扰动和通量测量的 gFCCs 的确定方法。可以以两种方式来利用 gFCCs：第一，通过比较不同 gFCCs 的大小有可能确定单个的通量控制系数，从而准确找出对目的通量施加强烈影响的反应；第二，通过连续的分组和分析，gFCCs 允许通量控制被限于很少的反应中。这些都将在 13.4 节中讨论。

（3）基于自上而下 MCA 和反应分组的结果，在 13.5 节中详细介绍对目的通量的优化。

在优化的过程中，很显然一般不可能对生物合成网络中的任何反应的速率进行任意增大。存在着中间代谢物浓度可允许的变化范围的限制。与这些限制相联系，作为一个同等重要的参数，产生组浓度控制系数（gCCCs），其为动力学变化对代谢物水平的影响提供了度量标准。由于代谢物水平的过度变化能够影响网络的稳定性，因此希望把它们维持在正常的稳定值附近。这意味着通过在强烈希望通量大幅增加与所允许的有限的代谢物浓度变化这一约束条件之间实行平衡，将得到最优的通量扩增。

（4）分析的最后一节（13.6 节）考虑实验误差对结果的影响，更重要的是，介绍了检验所用框架体系所固有假定的有效性的方法。为此目的，提供了内部一致性检验以确保所得到的结果没有违反这些关键性假定。

12.1 在单一分支点处通量分布的控制

在讨论复杂体系的性质之前，深入了解一下单一分支点的功能职责是有益的。虽然此分析仅仅包括三个反应的动力学相互作用，但它提供了对更复杂系统的功能作用的洞察力。在此讨论中出现的重要概念包括分支点的通量分布的柔性（见第 5 章、第 10 章）、在三个分支途径中的通量控制的分布和由连接代谢物浓度的极端水平所引起的代谢不稳定的可能性。在本章中用一个详尽的动力学分析来解释这些问题。通过应用 MCA 概念和研究作为该反应弹性的函数的通量控制系数的性质［如 11.4 节式（11.68）和式（11.69）所示］，也能得到同样的结论。这一节中的分析将应用到图 12.2 所示的简单分支点，这个途径包括三个反应：A，B 和 C。由反应 A 产生的连接代谢物 X 可被反应 B 或反应 C 利用，它可以独立地改动。然而，在稳态下，通过反应 A 的通量必须等于通过反应 B 和反应 C 的总通量。

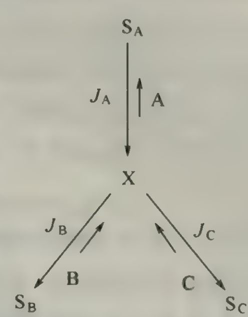


图 12.2 具有一个简单分支点的图示

分支点代谢物 X 由反应 A 生成，由反应 B 或反应 C 消耗，S_A、S_B 和 S_C 的外部浓度如同所有的动力学参数一样被认为固定不变

虽然在如图 12.2 所示的三个反应的动力学可以采用任何数学形式，但在这里采用了标准的 Michaelis-Menten 动力学方程。这样，对于一个将 S 转化为 P 的反应，其反应速率可以用下式表示：

$$v = v_{\max}\frac{c_S - c_P/K_{SP}}{K_{m,S} + c_S + c_P(K_{m,S}/K_{m,P})} \tag{12.1}$$

式中，c_S 是底物的浓度；c_P 是产物的浓度，剩下的参数是特定反应的动力学常数（非负）。式（12.1）表示了三个反应中每一个反应的净反应速率，正值表示由 S_A 转化到 S_B 和 S_C 的方向。和连接代谢物 X 的浓度一样，分支点处的柔性和通量在两条相互竞争的分支途径中的分布取决于三个反应的动力学曲线的共同控制。因此将考虑在其它代谢物浓度和参数都固定不变时，分支点代谢物 X 的浓度变化对速率的影响。此时，上游反应 A 的动力学有以下的形式：

$$v_A = v_{\max,\mathrm{eff}_A}\left(\frac{1 - k_{1_A}c_X}{1 + k_{2_A}c_X}\right) \tag{12.2}$$

每一个下游反应的动力学有以下的形式：

$$v_i = v_{\max,\mathrm{eff}_i}\left(\frac{c_X - k_{1_i}}{c_X + k_{2_i}}\right) \quad i \in \{B,C\} \tag{12.3}$$

式中对一特定反应的三个参数 k_1、k_2 和 $v_{max,eff}$ 均是所固定的动力学参数和 A 、B、C 的浓度的一个复合式。应注意到这些数值在上述三个反应速率中是不同的，此外，每一个参数都不是负值，正如实际的动力学常数一样（这些参数正是从实际的动力学常数导出的）。如果这些参数的每一个都不为零，则式（12.2）和式（12.3）具有双曲线的形式，如图 12.3 所示。对于每一个方程，正反应速率由最大有效速率 $v_{max,eff}$ 所限制。当 X 的浓度增加（对上游分支反应）或减小时（对下游分支反应），反应速率下降，最终达到逆反应的最大速率（k_1/k_2）$v_{max,eff}$。如果 k_1 和（或）k_2 为零，这些曲线将具有不同的形式，也如图 12.3 所示。在下面的讨论中，假定每一个速率方程都具有完全的双曲线形式。

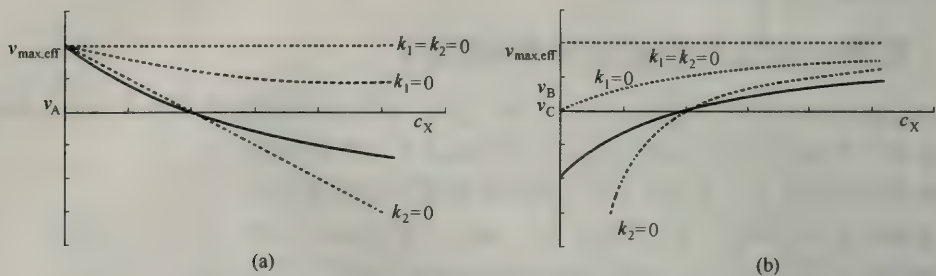


图 12.3　反应速率和连接代谢物浓度的关系

（a）上游分支途径 A 的速率；（b）下游一个分支途径（B 或 C）的速率。图中曲线分布根据式（12.2）和式（12.3）画出。虚线代表所指出的参数值固定为零的情况

在每一个分支点，为了利用上游分支途径所产生的连接代谢物 X，在下游分支之间存在着竞争。为了能够将这些概念扩展到复杂网络的控制中，正确理解发生在一个分支点的稳态操作情况下的竞争及因而围绕分支点的控制分布的复杂后果是很重要的。

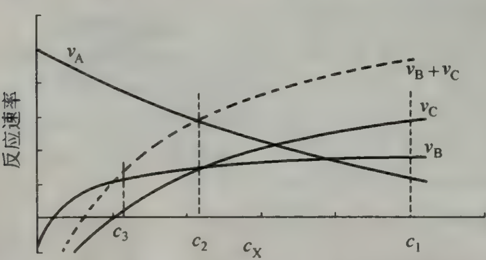


图 12.4　围绕分支点的三个反应的速率平衡

连接代谢物的稳态浓度在曲线 v_A 和曲线 v_B+v_C 的相交处。在此例中，是在浓度 c_2 处。一个分支点的刚性取决于稳态浓度时每条曲线的斜率

一个分支点的重要特点是它的通量分布，即两个下游反应之间的通量比。一般说来，通量的分布强烈地依赖于连接代谢物的浓度。例如，考虑具有如图 12.4 所示的典型反应曲线的两个下游反应（B 和 C）。如果 X 的浓度非常高（c_1），则两个反应都将处于它们的有效最大反应速率，而 c_X 的变化对它们的速率几乎都没有影响。也就是说，这些反应每一个对 c_X 的弹性几乎为零。这意味着在分支途径 B 和 C 之间的通量分布也就固定了，这时的分支点被定义为刚性分支点。另一种产生刚性分支点的情况是 c_X 的变化导致 B 和 C 的速率几乎按相同比例变化，因此通量分布仍保持不变。也就是说，每个反应对 X 增量的竞争大致是相等的，并导致相近的通量比。另一方面，如果 X 的浓度为 c_2，c_X 的一个小变化将导致 C 反应速率的变化比 B 反应速率的变化大得多。在这种条件下，两个反应相应于 c_X 的弹性是不同的，此时的分支点被定义为柔性分支点。实质上，反应 C 比反应 B 能对新增加的 X 更有效地竞争。

要注意：由于在稳态浓度下，B 和 C 的反应速率之和必然等于 A 反应的速率，因此连接代谢物的稳态浓度实际上依赖于三个反应的动力学。相应地，如果反应 A 的有效速率被

诱导而改变（例如：通过改变 S_A 的浓度或增大酶 A 的活性），c_X 将变化达到一个不同的稳态水平，导致在三个分支途径中的通量发生变化。分支点的刚性或柔性对通量分布所以变化的趋势提供了一个定性的解释。此外，利用下游反应相对于连接代谢物水平的弹性比能够量化通量分布的这种组合变换。

图 12.4 中的速率曲线也为理解围绕分支点的通量控制提供了基础。三个反应中每一个本征动力学的任何变化都将由图 12.4 中该速率曲线的变换来表示。所产生的通量变换的大小表明受到扰动的反应施加到每个分支途径的控制程度。例如：考虑分支 A 的速率变化，其会通过 X 的稳态浓度的变化而被传送到其它的分支途径。对于一个刚性分支点，每一条分支途径的通量将几乎按照同一比例变化。因此对于这样一个变化来说，它对三个反应的通量控制系数几乎是相等的。而且，如果反应 B 和反应 C 的速率都接近于它们的最大有效反应速率，对于所有三个反应来说，分支 A 中的任何变化的 FCC 值将几乎均为零。但是浓度控制系数 C_A^X 可能具有一个非常大的正值。另一方面，对于一个柔性分支点，反应 A 的变化将导致一个下游分支途径的变化比另一个大得多。因此，在图 12.4 中，初始浓度 c_2 处，反应 A 活性的很小下降将导致 X 的稳态浓度的下降，结果反应 C 中的通量比反应 B 中的通量下降大得多。确实，如果 X 的稳态浓度降至 c_3 以下，反应 C 甚至可能改变反应方向（假定 S_C 的供应保持不变）。在这种情况下，浓度控制系数 C_A^X 要比刚性分支点的情况具有较小的值，这反映了连接代谢物浓度的一个较小的变化。

下游分支所施加的控制也能用图 12.4 类似地想像。首先考虑在初始稳态浓度 c_1 时反应 B 活性的增加。这会有效地使反应 B 的曲线向上变化。在这种情况下，由于反应 C 的速率已经达到了稳定状态，因此，由于 X 的稳态浓度的下降所引起的通过反应 C 的通量仅有少许减少。但是，通过反应 A 和反应 B 的通量都将增加几乎相同的量。因此这样一个变化对反应 C 的通量控制系数 $C_B^{J_C}$ 将具有一个很小的负值，但 $C_B^{J_B}$ 和 $C_B^{J_A}$ 具有相当大的正值。由于通过反应 B 的通量的增加比通过反应 A 的通量的增加代表了相当大的比例，因此 $C_B^{J_B}$ 要比 $C_B^{J_A}$ 大得多，但一般小于 1。浓度控制系数 C_B^X 也将具有相当大的负值。

另一方面，如果分支点是柔性的（也就是当初始稳态浓度为图 12.4 所示的 c_2 时的情况），则发生竞争的反应速率曲线将会相对很陡。在这种情况下，反应 B 活性的增加（即 B 的反应曲线向上变化）将增加反应 B 的通量，同时伴随 X 的浓度下降和反应 C 通量的大幅降低。并且通过反应 A 的通量将会适量增加，而通过反应 B 的通量将大幅增加。实际上，这种活性变化主要引起通量由反应 C 转向反应 B。因此，$C_B^{J_C}$ 将具有一个很大的负值，$C_B^{J_B}$ 具有一个大的正值，$C_B^{J_A}$ 具有一个小的正值。最后，由于 X 的浓度在一个柔性分支点比在一个刚性分支点变化得更少，浓度控制系数 C_B^X 也将具有小的负值。

虽然当曲线具有不同的形式时可能发生另外的情况，但这些例子是典型分支点的代表，并为我们理解更复杂的网络奠定了基础。然而，在一个具有多个分支点的复杂网络中，这些分支点之间存在一定数量的反馈作用。在这种情况下，网络中特定部分的活性变化的影响不易通过图形来说明。在本章的剩余部分和下一章中，将用数学方法来对与围绕单一分支点的控制相类似的复杂网络中的控制进行分析。

最后应该注意的是，围绕一个分支点可能存在某些条件，它们限制着可允许的活性变化。尤其是，在一个刚性分支点中，上游分支途径的活性增加可能导致连接代谢物浓度陡然地增加，而没有显著改变下游途径中的通量。在图 12.4 中的浓度为 c_1 时情况就真的是这

样，这是由于此时反应 B 和反应 C 的速率曲线都已接近它们对应的最大值。而且，如果反应 A 的速率曲线与反应 B 和反应 C 的速率之和的曲线根本不相交，对于连接代谢物的浓度来说将没有稳态平衡的实数解。这种情况代表了一类代谢不稳定性，在此情况下实际代谢物的水平可能下降为零，也可能达到产生毒性的水平，或者诱导出利用它的替换代谢途径。因为其结果具有不可预测性，而且可能对细胞本身有害，所以在实际中这种代谢的不稳定性最好能够避免。在 13.5 节，将详细考虑这样的代谢不稳定性的复杂后果。

12.2 反应分组

正如上一章所讨论的，代谢控制分析传统上已被涉及各单个反应对网络通量的影响的确定。所以，确定控制系数的常用方法都基于扰动单个酶的动力学，并测量这种动力学扰动对通量的影响。这种自下而上的方法（其中每一个步骤是依次研究的）在对简单途径或只有少量步骤牵连于代谢控制的途径这种涉及上下前后关系的研究中是很有用的。但是，对于复杂的代谢途径，毫不夸张地说，其可能包括数百种不同的酶反应和运输步骤，其中许多步骤对通量施加很小的控制或没有施加控制，因此这种标准的方法就变得不切实际了。自上而下控制分析法（TDCA，见 11.2.2 节）作为一种替代的方法而得到发展。TDCA 的主要原则是将重点放在反应组而不是单个的反应步骤上。随着对不同反应组的评估，最后汇聚到对整个网络的动力学控制施加主要控制的单个反应或反应组上。这种方法论对于考虑在代谢网络中通常存在大量反应的情况是很必要的。

严格地说，应用 TDCA 的一个要求是，环绕连接代谢物的各反应组之间必须是完全相互孤立的，即仅仅通过连接代谢物发生联系。在许多情况下，不可能找到符合以上原则的连接代谢物。但是在这里介绍的方法对这种完全孤立的限制有所放松，允许在所研究的网络中展现诸如反馈抑制这样的相互作用。既然存在这些限制以至这些相互作用能够被现在的方法所容纳，将在 13.6 节再次关注这个重要的问题。此外，这里介绍的方法能够将诸如自由能的产生过程或生长导致的通量膨胀过程这样的偶联生物过程与主要的与碳有关的生物合成通量有效地分离开来。由于这些耦联生物过程的特性，通过这种分析所定义的反应分组通常与依据生化反应图所建议的分组是不同的。

12.2.1 组通量控制系数

一个组通量控制系数（组 FCC 或 gFCC）的定义是当把整个反应组作为一个单个的反应步骤时所应该存在的通量控制系数。如图 12.5(a)中所示的未分支反应途径中的 A 组是一个反应组的简单例子。如果框 A 内的每一步反应的活性按照相同的比例被改变，则反应组 A 对自己的通量 ${}^{*}C_{\mathrm{A}}^{J_{\mathrm{A}}}$ 的 gFCC 可以定义为：途径通量所产生的相对变化（$\mathrm{d}J_{\mathrm{A}}/J_{\mathrm{A}}$）与反应组中每一步反应活性相对变化（也就是整个组的活性变化，$\mathrm{d}^{*}v_{\mathrm{A}}/{}^{*}v_{\mathrm{A}}$）的比值：

$$ {}^{*}C_{\mathrm{A}}^{J_{\mathrm{A}}} \equiv \frac{\mathrm{d}J_{\mathrm{A}}}{\mathrm{d}^{*}v_{\mathrm{A}}} \times \frac{{}^{*}v_{\mathrm{A}}}{J_{\mathrm{A}}} \tag{12.4} $$

这个定义是对经典的 FCC 定义（Kacserh and Burns，1973）对 TDCAC（Brown，et al，1990）的一个扩展。注意，通量和反应速率的上标（*）表示这些量是对应于反应组而不是单个反应的。

由于实际上不可能使一个反应组中所有的反应发生同样幅度的变化，为了通过 gFCC 的实验确定，必须在反应组中一个或多个反应发生扰动之后通过通量和通量变化的测量来进行。需要强调的是反应分组是用一个事实上的总反应替代了所有的单个反应，总反应的

gFCC 等于反应组中单个反应的 FCCs 之和（这是 MCA 加和定理的结果）。

gFCC 的概念很容易被扩展到诸如图 12.5(b)所示的网络中的分支代谢途径。这里一个附加的棘手的问题是：每当有分支反应的时候，都需要确定其中一个分支途径的变化对流经所有三个分支途径通量的影响。结果是对于每一个代谢网络中的分支途径都有三个 gFCCs，而不是一个通量控制系数，这样总共就有九个 gFCCs。在更复杂的代谢网络中，可以围绕几种不同的代谢物识别反应组。在这种情况下，环绕每一个连接代谢物的反应组的 gFCCs 被分别确定。依据不同重叠反应组的 gFCCs 的数值可以确定这些重叠反应组之间所共有的反应的 gFCCs 数值。这些 gFCCs 转而定义了由中间代谢物连接较小的反应组所施加的控制程度（这里，中间代谢物连接指介于两个不同连接代谢物之间的短途径）。正如 13.4 节所讨论的，这些 gFCCs 能用来缩小搜索具有大的 FCCs 值的单个步骤的范围。

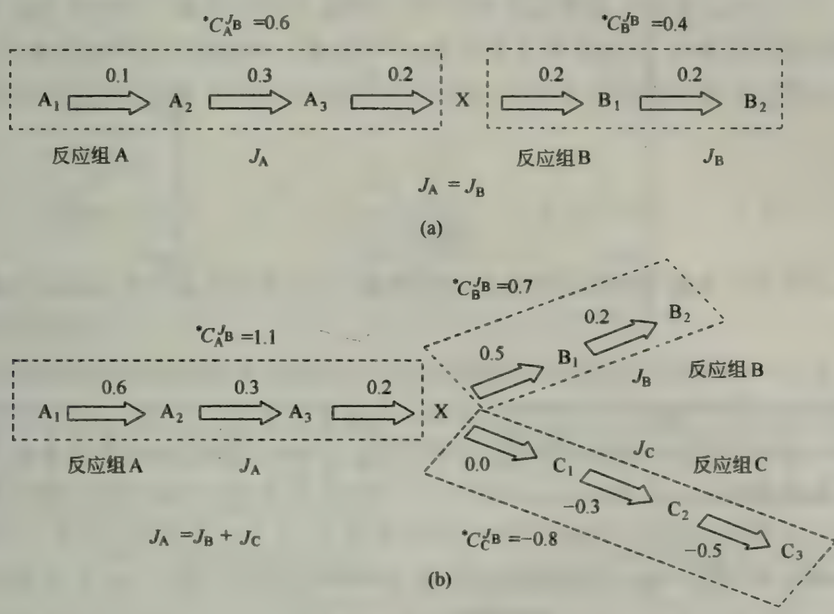


图 12.5 反应组

对未分支途径（a）和分支途径（b）中围绕连接代谢物 X 的反应进行典型的分组。图中也标出了各组之间的所需的通量平衡，以及各单个反应和反应组对反应组 B 的通量控制系数

12.2.2 独立途径的识别

一条独立途径的定义是：将一个单个的网络输出同一些必需的网络输入以某种方式相连接，从而使内部物质的浓度水平达到稳态的最小的一组反应（Simpson et al，1995）。要求有一个稳定不变的内部代谢库，以确保在一个恒定的输入下系统能够达到稳态。对于一个由 L 个反应和 K_0 个独立可变的内部代谢物（内部代谢物的代谢库都应该能达到一个稳态）组成的网络，最大的独立途径数 P 可用式（12.5）来表示：

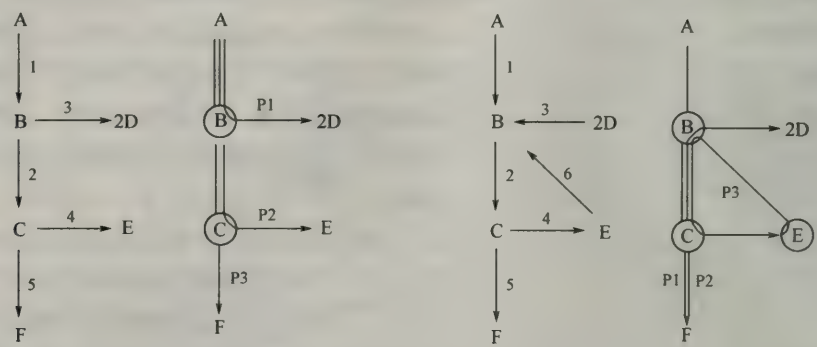
$$P=L-K_0 \tag{12.5}$$

对图 12.6(a)和 12.6(b)中的简单例子来说，能够很容易地识别三条独立途径（P1、P2 和 P3），正如图中所示的。对于更复杂的网络，例如图 12.1 所示的那种网络，独立途径并不明显，需要一种系统的方法来识别它们。为此，首先从定义一个稳态内部代谢物化学计量（steady-state internal metabolite stoichiometry，SIMS）矩阵开始，该矩阵严格地描述此网

络的化学计量关系（Reder，1988）。SIMS 矩阵 **N**（以另外的方式称作图表矩阵）是一个 $K \times L$ 矩阵，其中 K 是网络中明确清楚的稳态代谢物数目，L 是确切的反应数目。如果每一个反应写成式（12.6）的形式，则此矩阵中的每一个元素 N_{ji} 是参与反应 i 的代谢物 X_j 的化学计量系数 g_{ji}。

$$\sum_{\text{反应物}}(-g_{ji}X_j)+\sum_{\text{产物}}(g_{ji}X_j)=0 \tag{12.6}$$

为了确保基于下述方法的反应分组能够准确地进行，上式所描述的每一个反应的方向必须同它在实际网络中的净通量方向相一致，这一点是很重要的。这样，由于图 12.6(a)中所示的通过反应 3 的净通量方向同图 12.6(b)中的相反，所以相应的 SIMS 矩阵中两列的符号是相反的。



N

物质	反应				
	1	2	3	4	5
B	1	−1	−1	0	0
C	0	1	0	−1	−1

K

反应序号	途径		
	P1	P2	P3
1	1	1	1
2	0	1	1
3	1	0	0
4	0	1	0
5	0	0	1

(a)

N

物质	反应					
	1	2	3	4	5	6
B	1	−1	1	0	0	1
C	0	1	0	−1	−1	0
E	0	0	0	1	0	−1

K

反应序号	途径		
	P1	P2	P3
1	1	0	0
2	1	1	1
3	0	1	0
4	0	0	1
5	1	1	0
6	0	0	1

(b)

图 12.6　独立途径的识别

图中展示两个样本反应网络和它们的独立途径及其 SIMS 矩阵和核心矩阵

(a) 在多个输出间具有分支的网络；(b) 在多个输入和一条循环途径之间具有分支的网络

严格地说，SIMS 矩阵是第 8 章中介绍的化学计量矩阵 **G** 的子集，**G** 也由上式定义但它是相对于网络中的所有代谢物而言的。因此，任何作为原料或汇点（sink）的外部代谢物在化学计量矩阵中都有相应的行，而在 SIMS 矩阵中却没有。由于 B 和 C 是图 12.6(a)中能保持稳态的仅有的两种代谢物，因此系统的 K 值为 2（由于这两种代谢物的浓度可独立变动，所以 K_0 也为 2）。因此物质 A、D、E 和 F 不包括在所产生的 SIMS 矩阵中。

在 SIMS 矩阵中很容易识别两类重要的反应：输出步骤和输入步骤。一个输出步骤仅仅产生外部物质，在 SIMS 矩阵中用没有正值的列来表示。一个输入步骤仅仅消耗外部物质，在 SIMS 矩阵中用没有负值的列来表示，输出步骤的识别特别有助于下面所示的独立途径的

列举。

一旦令人满意地构建了 SIMS 矩阵，独立途径就可作为 SIMS 矩阵 **N** 的核心矩阵的向量而被获得。由定义，一个核心矩阵（kernel matrix）**K** 是式（12.7 ）的任何非无效解(nontrivial solution)。

$$\mathbf{N}\cdot\mathbf{K}=0 \tag{12.7}$$

图 12.6(a)和 12.6(b)对相应的网络用所示的 SIMS 矩阵 **N** 和核心矩阵 **K** 举例说明了这些概念。注意，核心矩阵向量的表列值代表了在相应的独立途径中被完全利用的反应的相对速率。这样，如果 K_{ij} 是核心矩阵 **K** 的元素，则 K_{1j} 代表代谢物 A 专门对图 12.6(a)的途径 $j\in\{1, 2, 3\}$ 所消耗的相对速率（即反应 1 的相对速率）。反应 1 的总速率（等于 A 的总消耗速率）应等于 $K_{11}+K_{12}+K_{13}$。式（12.7）中核心矩阵和 SIMS 矩阵的乘积只不过是对三条独立途径中的每一条对中间代谢物 B 和 C 的稳态平衡（共有 2×3 个方程）。这样，图 12.6(a)中核心矩阵第一列表明了途径 P1 包括反应 1 和反应 3，并且依所表示的化学计量学，A 将转化为 2D 而没有 B 或 C 的净产生，这是通过如下定义途径 P1 的一系列反应进行的：

$$\begin{array}{c} \mathrm{A}\rightarrow\mathrm{B} \\ \underline{\mathrm{B}\rightarrow 2\mathrm{D}} \\ \mathrm{A}\rightarrow 2\mathrm{D} \end{array}$$

如果各步骤之间的化学计量比不是 1:1，则对应于适当的比值的数值将出现在核心矩阵的表列值中（见 12.3 节）。

核心矩阵的确切组成确实是任意的，因为如果矩阵中的任何一列乘以一个常数或同任何其它的列相加，式（12.7）仍然是有效的。实际上，对核心矩阵的惟一正式的限制是它必须是满秩的，且各列之间相互独立。然而，为了确定反应组和连接代谢物的目的，定义一个可能的最简单的核心矩阵就已经足够了。对于一个具有 K_0 个独立稳态代谢物的网络来说，在每条途径的 L 个反应速率中存在 K_0 个稳态关系。因此，在每一条途径的各个反应速率的确定中，自由度为（$L-K_0$），或者说，等价于核心矩阵的列数。通过选择核心矩阵的元素以致每一列对应于核心矩阵的基的基础向量，于是就能够确立每一条独立途径的结构。核心矩阵的基通常由核心矩阵中的（$L-K_0$）个行组成，其所对应的这些反应步骤对一条单个独立途径各自都是惟一的。将这些步骤称为本征反应或特征反应，因为如下面将要讨论的，它们惟一地确定每一条独立途径的化学计量组成和通量。这些步骤一般可以识别为产生不同产物的输出步骤，但也可能包括为了循环或替代的输入所需的步骤。实际上，最常见的是每一条独立途径都与一种不同产物的生成相联系，并与每一个其它独立途径的产物相竞争。

从图 12.6（a）的例证图示中可以明显看出，三个自由度定义了三个反应的基。因为对基的明显的选择是三个输出步骤（反应 3、反应 4 和反应 5)，按照这三个反应步骤的基本向量，可以确定核心矩阵的每一列。分别将核心矩阵中代表反应 3、反应 4 和反应 5 的列的值设定为 100，010 和 001，并用式（12.7）来确定该矩阵的其它元素。如果用了一个满意的基，这种方法就可以得到一个不含有负值元素的完整核心矩阵。由于利用了核心矩阵的基的基本向量，网络中观察到的任何稳态都将是通过由上述方法所确立的途径的基本通量（即通过特征反应的通量）的线性组合。而且，一旦每条途径的特征反应已被识别，仅仅将通过特征反应的通量乘以矩阵中的相应列的每一个值就可以得到通过每条途径的实际通量。以图 12.6(a)为例，由于基是由步骤 3 ～ 5 所组成，途径 P1、途径 P2 和途径 P3 的特征反应分别

是反应 3、反应 4 和反应 5。这样，通过每一步的通量可表示为：

$$\begin{bmatrix} J_1 \\ J_2 \\ J_3 \\ J_4 \\ J_5 \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} K_{11} \\ K_{21} \\ 1 \\ 0 \\ 0 \end{bmatrix} J_3 + \begin{bmatrix} K_{21} \\ K_{22} \\ 0 \\ 1 \\ 0 \end{bmatrix} J_4 + \begin{bmatrix} K_{13} \\ K_{23} \\ 0 \\ 0 \\ 1 \end{bmatrix} J_5 \tag{12.8}$$

【例 12.1】 通过矩阵代数来确定核心矩阵

对于图 12.6（b）所示的网络和 SIMS 矩阵，它的核心矩阵可以通过应用式（12.7）得出。在该网络中有 5 个反应和两个独立的稳态代谢物，所以，按照式（12.5）将有三个独立途径。对于这个系统，式（12.7）变为：

$$\begin{bmatrix} 1 & -1 & -1 & 0 & 0 \\ 0 & 1 & 0 & -1 & -1 \end{bmatrix} \begin{bmatrix} K_{11} & K_{12} & K_{13} \\ K_{21} & K_{22} & K_{23} \\ K_{31} & K_{32} & K_{33} \\ K_{41} & K_{42} & K_{43} \\ K_{51} & K_{52} & K_{53} \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 \end{bmatrix} \tag{1}$$

如果核心矩阵的元素 K_{ij} 被解释为全部由途径 Pj 所利用的反应 i 的速率，那么就可以更好地领会式（1）的含义。在这种情况下，在矩阵表达式中所概括的 6 个式子简单地反映了两个中间代谢物 B 和 C 对三条独立途径中的每一条的稳态平衡。

式（1）表示了一个由含有 15 个未知数的 6 个方程组成的方程组。从这 15 个未知的 K 中任意选出其中的 9 个产生出不同每种情况的核心矩阵。然而，所有这些核心矩阵的列都仅仅是形成系统的基的三个基本列的线性组合。显然，最简单的核心矩阵就是对应于这个基的矩阵。这可以通过选择任意一些 K 值组成单位矩阵，并使之作为核心矩阵中下面的 3×3 部分。以这种形式，基就由三个输出反应步骤 3、步骤 4 和步骤 5（它们分别是途径 P1、途径 P2 和途径 P3 的特征反应）所定义，这是因为这些步骤的每一个步骤仅仅发生在它相应的独立途径中。一旦确定了基，核心矩阵中的其它表列值的值就可以通过对式（2）所表示的线性方程组求解而得到。还要注意到，式（1）矩阵中 K 的绝对值大小是不重要的，因为核心矩阵中的每一列都可以独立地扩大或缩小（be scaled independently）。

$$\begin{bmatrix} 1 & -1 & -1 & 0 & 0 \\ 0 & 1 & 0 & -1 & -1 \end{bmatrix} \begin{bmatrix} K_{11} & K_{12} & K_{13} \\ K_{21} & K_{22} & K_{23} \\ 1 & 0 & 0 \\ 0 & 1 & 0 \\ 0 & 0 & 1 \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 \end{bmatrix} \tag{2}$$

如果完成式（2）的左边所示的乘法运算，可以得到一组含有 6 个线性方程的方程组

$$\begin{bmatrix} K_{11} - K_{21} - 1 & K_{12} - K_{22} & K_{13} - K_{23} \\ K_{21} & K_{22} - 1 & K_{23} - 1 \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 \end{bmatrix} \tag{3}$$

可容易解得：

$$K_{11} - K_{21} = 1$$
$$K_{12} - K_{22} = 0$$

$$K_{13}-K_{23}=0 \tag{4}$$

$$K_{21}=0$$

$$K_{22}=1$$

$$K_{23}=1$$

将这些方程转换成矩阵形式，通过矩阵求逆可以确定核心矩阵中的其余元素：

$$\begin{bmatrix} K_{11} \\ K_{12} \\ K_{13} \\ K_{21} \\ K_{22} \\ K_{23} \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} 1 & 0 & 0 & -1 & 0 & 0 \\ 0 & 1 & 0 & 0 & -1 & 0 \\ 0 & 0 & 1 & 0 & 0 & -1 \\ 0 & 0 & 0 & 1 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 1 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 1 \end{bmatrix}^{-1} \begin{bmatrix} 1 \\ 0 \\ 0 \\ 0 \\ 1 \\ 1 \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} 1 \\ 1 \\ 1 \\ 0 \\ 1 \\ 1 \end{bmatrix} \tag{5}$$

所产生的核心矩阵同图 12.6(a)中所示的一样，为：

$$\mathbf{K} = \begin{bmatrix} 1 & 1 & 1 \\ 0 & 1 & 1 \\ 1 & 0 & 0 \\ 0 & 1 & 0 \\ 0 & 0 & 1 \end{bmatrix} \tag{6}$$

在一个足够简单的系统中，可以按照以下程序步骤，通过对网络图的简单的查看来构建核心矩阵。

(1) 从核心矩阵的第一列开始，把 1 放在对应于一个输出步骤的第一列某一行上，并留心注意该反应所消耗的代谢物。

(2) 确定哪个（或哪些）步骤产生由上述步骤（1）所识别的输出步骤所消耗的代谢物。

(3) 如果所识别的代谢物仅由一步反应所产生，则在对应于那个反应的当前列的表列值处放入该反应必须进行的次数的数值，该反应必须继续进行是为了生产足够多的代谢物以平衡由前面的反应步骤所消耗的量；通常这个数值为 1。如果多于一个反应能产生该代谢物，把全部当前列的表列值复制到下一列（或一些列）中并用第一个选择继续构建当前列。一旦这一列完成之后，用另外的选择构建下一列（或一些列)。

(4) 如果所识别的反应不是一个输入步骤，则用那个反应重复步骤(2)～步骤(4)。如果是一个输入步骤，则完成了这一列的构建，而且在它的剩余行的值均为零。如果所识别的反应在这一列中已经被使用了，这会是在相应的行已经存在的一个数值。这表示有一个循环反应，在此情况下，该已识别的反应的下游的表列值应当用零来取代。

(5) 从任何其它输出步骤着手，重复步骤(1)～步骤(4)。

留作一个练习：通过上述方法以重新构建图 12.6 中所示的核心矩阵。

在复杂网络中，反应可能具有多个反应物，这就使对代谢物进行选择以保持平衡更复杂了。在这些情况下，首先从一个仅由一个特定反应生成的代谢物来开始是最容易的。在对这个代谢物的产生解决之后，任何由先前步骤剩下的未平衡的代谢物必须接着被平衡。包括多个输入、多个输出和存在耦联途径的附加网络特性可能使通过简单的查看来确定一个核心矩阵变得很困难。在这些情况下，通过对矩阵方程求解来构建一个核心矩阵也许要比通过上面

的步骤靠手工对反应进行平衡更为简单。这些问题将通过对芳香族氨基酸生产的研究实例来做更详细的说明。

12.3 实例研究——芳香族氨基酸的生物合成途径

在这一节中，将通过对 *S. cerevisiae* 中芳香族氨基酸生物合成的研究实例来示范证明连接代谢物和反应组识别的方法论。首先对这个系统进行一下描述，然后接着进行独立途径和连接代谢物的识别。

12.3.1 *S. cerevisiae* 中芳香族氨基酸生物合成模型

这个研究实例是基于已发表的 *S. cerevisiae* 生物化学的动力学模型（Galazz and Bailey，1990，1991）。图 12.1 列出其生物合成网络图，该网络耦合了中心碳代谢、自由能的生成及氨基酸生物合成。这个网络描述了如何由葡萄糖为惟一碳源，从简单的前体物来合成三种芳香族氨基酸：色氨酸、苯丙氨酸和酪氨酸。这个模型中的其它代谢功能包括以多糖和甘油形式存在的储藏化合物（storage compounds）的合成、自由能的生成和利用，以及为了维持生长对自由能过量合成的需要等。

为了举例说明所用的分析方法的目的而采用这个系统时，既是出于方便的需要，也为了努力使它与细胞的已知的生化特性更好地相符，对原始模型作了几处专门的调整。更重要的是，细胞生长对代谢物浓度水平和氨基酸平衡的影响被忽略不计了，这样做有简化代谢物平衡和代谢途径表示的主要作用。在一个代谢平衡网络中的细胞生长包括用一个扩展通量（flux to expansion）J_j^E 来表示，它按照与代谢物浓度成比例的一个因子来消耗每一种代谢物 X_j：

$$J_j^E = \mu c_j \tag{12.9}$$

式中，μ 是比生长速率；c_j 是代谢物 X_j 的浓度。这个扩展通量实质上可以处理为与一个单个生长有关的反应，它以前述的速率来消耗代谢网络中每一种与生长有关的代谢物。这些通量在分析中没有直接明确地说明，但已被并入了一个通用的一级消耗反应的步骤中，因为：(a) 它们的量一般比较小，(b) 在代谢网络的控制结构和通量扩增的确定中，它们常常是不重要的，(c) 它们不是代谢物被消耗的惟一机制。这些消耗反应步骤的速率常数已经被确定，并达到了像原始模型一样的稳态条件下的总的氨基酸浓度和代谢通量。这些反应步骤（图 12.1 中反应 16，反应 17 和反应 18），可以看做是为了进行蛋白质合成或者其它细胞过程而进行的氨基酸吸收利用以及这三种氨基酸的降解和胞外运输的总和。此外，由转羧基酶催化（反应 9）生成的磷酸戊糖的生成和消耗在化学计量学中已经被清楚地考虑了，然而在原始模型中它们已被与 6-磷酸葡萄糖归并在一起。这也引起了为使 5-磷酸木酮糖返回到糖酵解途径而引入的一个的循环反应 15。应该注意的是：尽管有了这些变化，但系统的稳态速率和浓度同 Galazzo 和 Bailey 模型的结果严密匹配。

所产生的代谢网络中包括 13 个代谢物，它们参与了 18 个反应，形成了几个分支途径和循环途径，并且展现出显著的反馈抑制和别构抑制。因此，这个系统非常适合用来对复杂代谢网络进行描述和分析。

表 12.1 提供了这个网络中存在的反应一览表。要注意的是表 12.1 中有几个反应是由一些单个反应合并而成的，这些单个反应和合并后的总反应在化学计量学上是等价的。这样，在葡萄糖被运输进细胞内并发生磷酸化作用之后（反应 1、反应 2），6-磷酸葡萄糖（G6P）通过一系列反应（归并成反应 3）转化为多糖（Pol）或通过反应 4 在糖酵解途径中进一步

被磷酸化以形成1,6-二磷酸果糖（FDP）。FDP（或者它的平衡等价物：3-磷酸甘油醛，GAP）被催化形成磷酸烯醇丙酮酸（PEP）并进一步形成乙醇（通过丙酮酸），同时以ATP的形式释放出自由能（反应5和反应6）。以另外的形式，GAP通过一条不同途径（反应7）被转化为甘油（Gol）。最终形成芳香族氨基酸的莽草酸途径由磷酸戊糖途径中的中间产物5-磷酸木酮糖（X5P）和4-磷酸赤藓糖的合成开始（未标出），然后4-磷酸赤藓糖和PEP缩合成3-脱氧-D-阿拉伯型庚酮糖酸-7-磷酸（DAHP）。这两步结合成反应9。分支酸（CHR）由DAHP通过一系列反应形成（如反应10所示）。然后分支酸进一步转化成预苯酸（PPH）并最终通过一系列反应形成苯丙氨酸（Phe）和酪氨酸（Tyr）（分别归并为反应11、反应12和反应13）。分支酸的另一个去处是其还可以通过由反应14表示的色氨酸合成途径形成色氨酸（Trp）。这条途径除分支酸外还要消耗X5P，并且还需要将PEP转变为GAP的循环反应。剩下的X5P通过反应15循环到GAP。反应16～反应18表示了氨基酸的输出、降解和利用步骤。

表12.1　氨基酸生物合成网络中的化学反应计量式

反　应①	反应计量式②
1	$Glc_{ext} \longrightarrow Glc$
2	$Glc + ATP \longrightarrow G6P + ADP$
3	$G6P + ATP \longrightarrow ADP + Pol + 2P_i$
4	$G6P + ATP \longrightarrow FDP + ADP$
FDP/GAP③	$FDP \rightleftharpoons 2GAP$
5	$GAP + ADP + P_i \longrightarrow PEP + ATP$
6	$PEP + ADP \longrightarrow ATP + EtOH + CO_2$
7	$GAP \longrightarrow Gol + P_i$
8	$ATP \longrightarrow ADP + P_i$
9	$G6P + GAP + PEP \longrightarrow X5P + DAHP + P_i$
10	$PEP + DAHP + ATP \longrightarrow CHR + ADP + 3P_i$
11	$CHR \longrightarrow PPH$
12	$PPH + ATP + NH_3 \longrightarrow Phe + ADP + P_i$
13	$PPH + ATP + NH_3 \longrightarrow Tyr + ADP + P_i$
14	$PEP + X5P + CHR + 4ATP + NH_3 \longrightarrow GAP + Trp + 4ADP + EtOH + 2CO_2 + 3P_i + PP_i$
15	$X5P + ADP + P_i \longrightarrow GAP + ATP + CO_2$
16	$Phe \longrightarrow Phe_{ext}$
17	$Tyr \longrightarrow Tyr_{ext}$
18	$Trp \longrightarrow Trp_{ext}$
腺苷④	$ATP + AMP \rightleftharpoons 2ADP$

① 反应号同图12.1中的反应相对应。

② 表中用黑体字表示的代谢物处于稳态，有几个反应是由一些单个酶催化反应合并而成。

③ 这个反应代表了FDP和丙糖之间的平衡，因此丙糖被看做一个单一的代谢库。

④ 这个反应代表了ATP、ADP和AMP之间的平衡。

注：缩写符号的意义如下：CHR—分支酸；DAHP—3-脱氧-D-阿拉伯型庚酮糖酸-7-磷酸；FDP—1,6-二磷酸果糖；G6P—6-磷酸葡萄糖；GAP—3-磷酸甘油醛；Glc—葡萄糖；PEP—磷酸烯醇丙酮酸；Phe—苯丙氨酸；PPH—预苯酸；Pol—多糖；Trp—色氨酸；Tyr—酪氨酸。

除了和碳骨架合成有关的代谢物的生成和消耗之间要保持平衡之外，在这个网络中的一个稳态——ATP的生成和消耗也必须保持平衡，如表12.1所示。这些ATP的生成和消耗反应在图12.1中分别以圆形和菱形来代表，并用它们来强调各种反应和网络中不是由直接的化学计量平衡推导而来的部分之间存在着强烈的耦合作用。反应8表示超出其它反应步骤

需要的 ATP 转变为 ADP，这个反应可被理解为 ATP 被其它生物合成反应，如细胞维持，或无效循环所消耗。

表 12.2 提供了动力学表达式和物质平衡，用于定义作为这项分析的基准的稳态条件。这个模型的代谢物平衡的解所产生的稳态代谢物浓度和通量如表 12.3 所示。

表 12.2 氨基酸生物合成网络中反应的动力学表达式和物料平衡

反　应[1]	动力学表达式[2]
1	葡萄糖吸收： $v_{\mathrm{Glc,in}}=200-132.5[\mathrm{G6P}]$
2	葡萄糖磷酸化： $v_{\mathrm{Glc}}=68.5\left(\frac{0.00062}{[\mathrm{Glc}][\mathrm{ATP}]}+\frac{0.11}{[\mathrm{Glc}]}+\frac{0.1}{[\mathrm{ATP}]}+1\right)^{-1}$
3	多糖的形成： $v_{\mathrm{Pol}}=15.74\left(\frac{[\mathrm{G6P}]^{8.51}}{193+[\mathrm{G6P}]^{8.51}}\right)\left(\frac{2.558}{[\mathrm{G6P}]^2}+\frac{2.326}{[\mathrm{G6P}]}+1\right)^{-1}$
4	6-磷酸葡萄糖异构酶和磷酸果糖激酶(PFK)： $v_{\mathrm{PFK}}=\frac{3019[\mathrm{G6P}][\mathrm{ATP}]R}{R^2+6253L^2T^2}$ $R=1+0.5714[\mathrm{G6P}]+16.67[\mathrm{ATP}]+95.24[\mathrm{G6P}][\mathrm{ATP}]$ $L=\left[1+0.76\left(\frac{[\mathrm{ADP}]^2}{[\mathrm{ATP}]}\right)\right]\left[1+40\left(\frac{[\mathrm{ADP}]^2}{[\mathrm{ATP}]}\right)\right]^{-1}$ $T=1+0.0002857[\mathrm{G6P}]+16.67[\mathrm{ATP}]+0.004762[\mathrm{G6P}][\mathrm{ATP}]$
5	3-磷酸甘油醛脱氢酶： $v_{\mathrm{GAPD}}=99.6\left[1+\frac{0.25}{[\mathrm{FDP}]}+\left(0.09375+\frac{6.273}{[\mathrm{FDP}]}\right)A\right]^{-1}$ $A=1+\frac{\left(\frac{[\mathrm{ADP}]^2}{[\mathrm{ATP}]}\right)}{1.1}+\frac{[\mathrm{ADP}]}{1.5}+\frac{[\mathrm{ATP}]}{2.5}$
6	丙酮酸激酶和丙酮酸还原生成 CO_2 和乙醇： $v_{\mathrm{PK}}=9763[\mathrm{PEP}][\mathrm{ADP}]\frac{R+0.3964L^2T}{R^2+311.2L^2T^2}$ $R=1+157[\mathrm{PEP}]+0.2[\mathrm{ADP}]+3.14[\mathrm{PEP}][\mathrm{ADP}]$ $L=\frac{1+0.05[\mathrm{FDP}]}{1+5[\mathrm{FDP}]}$ $T=1+0.02[\mathrm{PFP}]+0.2[\mathrm{ADP}]+0.004[\mathrm{PEP}][\mathrm{ADP}]$
7	甘油的生成： $v_{\mathrm{Gol}}=0.068v_{\mathrm{GAPD}}$
8	非专一性的 ATP 降解和利用： $v_{\mathrm{A}}=12.1[\mathrm{ATP}]$
9	转羧基反应生成 E4P 和 X5P,接着由 E4P 和 PEP 生成 DAHP： $v_{\mathrm{T}}=4568\frac{\frac{0.79}{\left(1+\frac{[\mathrm{Phe}]}{53}\right)}+\frac{0.2}{\left(1+\frac{[\mathrm{Tyr}]}{40}\right)}+\frac{0.01}{\left(1+\frac{[\mathrm{Trp}]}{16}\right)}}{\left(\frac{0.0002}{[\mathrm{PEP}][\mathrm{G6P}]}+\frac{0.06}{[\mathrm{PEP}]}\right)(2+[\mathrm{CHR}])(0.9281+[\mathrm{ATP}])\left(1+\frac{[\mathrm{Trp}]}{16}\right)}$

反　　应[1]	动力学表达式[2]
10	通过莽草酸途径消耗DAHP,接着将莽草酸变为分支酸: $v_D=\frac{116[DAHP][PEP][ATP]}{(2+[ATP])(0.008665+[PEP])(0.921+[ATP])}$
11	预苯酸的生成: $v_{PPH}=475.4[CHR]\left[(2+[CHR])\left(1+\frac{[Phe]}{50}\right)\left(1+\frac{[Tyr]}{40}\right)\right]^{-1}$
12	苯丙氨酸的生成: $v_{Phe}=63.4[PPH]\left[(1+[PPH])\left(1+\frac{[Phe]}{50}\right)\right]^{-1}$
13	酪氨酸的生成: $v_{Tyr}=\frac{10.48[PPH]}{1+[PPH]}$
14	色氨酸的生成: $v_{Trp}=\frac{75.6[X5P][CHR][ATP]}{(1.269+[X5P])(2+[CHR])(0.9281+[ATP])\left(1+\frac{[Trp]}{16}\right)}$
15	X5P降解为GAP和乙醇: $v_X=17[ADP]\frac{[X5P]}{0.8+[X5P]}$
16	苯丙氨酸运输、降解、利用: $v_{Phe,out}=0.013[Phe]$
17	酪氨酸运输、降解、利用: $v_{Tyr,out}=0.013[Tyr]\times 10$
18	色氨酸运输、降解、利用: $v_{Trp,out}=0.013[Trp]$
腺苷[3]	腺苷磷酸类总量的平衡: $[ATP]+[ADP]+\left(\frac{[ADP]^2}{[ATP]}\right)=3$

代　谢　物	物　料　平　衡
Glc	$v_{Glc,in}=v_{Glc}$
G6P	$v_{Glc}=v_{Pol}+v_{PFK}+v_T$
FDP	$v_{PFK}+\frac{1}{2}v_{Trp}+\frac{1}{2}v_X=\frac{1}{2}v_{GAPD}+\frac{1}{2}v_{Gol}+\frac{1}{2}v_T$
PEP	$v_{GAPD}=v_{PK}+v_T+v_D+v_{Trp}$
ATP,ADP	$v_{GAPD}+v_{PK}+v_X=v_{Glc}+v_{Pol}+v_{PFK}+v_D+v_{Phe}+v_{Tyr}+4v_{Trp}$
DAHP	$v_T=v_D$
CHR	$v_D=v_{PPH}+v_{Trp}$
PPH	$v_{PPH}=v_{Phe}+v_{Tyr}$
X5P	$v_T=v_{Trp}+v_X$
Phe	$v_{Phe}=v_{Phe,out}$
Tyr	$v_{Tyr}=v_{Tyr,out}$
Trp	$v_{Trp}=v_{Trp,out}$

① 反应序号与图12.1中的反应相对应。
② 基态的摩尔反应速率（$mmol\cdot L^{-1}\cdot min^{-1}$）是中间代谢物浓度（$mmol\cdot L^{-1}$）的函数。
③ 最后一个表达式代表总的腺苷浓度的平衡，也就是ATP、ADP和AMP之间的平衡。

表 12.3 氨基酸生物合成网络的稳态代谢物浓度和通量

内部代谢物	浓度/mmol·L^{-1}	反　　应①	摩尔通量/mmol·L^{-1}·min^{-1}
Glc	0.17	1	31.67
G6P	1.27	2	31.67
FDP	23.0	3	0.14
PEP	0.014	4	23.30
ATP	0.20	5	43.63
DAHP	3.74	6	26.15
CHR	7.87	7	2.97
PPH	0.55	8	2.44
X5P	1.48	9	8.24
Phe	271	10	8.24
Tyr	286	11	7.24
Trp	76.7	12	3.52
ADP	0.66	13	3.72
		14	1.00
		15	7.24
		16	3.52
		17	3.72
		18	1.00

① 反应序号与图 12.1 中的反应相对应。

12.3.2 独立途径的确定

这个网络的 SIMS 矩阵是通过表 12.1 中的化学计量式来构建的，如表 12.4 所示。注意，由于相应于 ATP 和 ADP 的数据行互为镜像关系，因此在这个矩阵中的 13 种代谢物只有 12 种是真正独立的。因此，式（12.5）表明从 18 个反应中可以构建总共 6 条独立途径，其中每一条对应于 6 个输出反应中的 1 个。这些反应（反应 3、7、8、16、17 和反应 18）被识别为该网络的特征反应，因此它们构成了核心矩阵的基（严格地说，反应 3 和反应 8 是 ATP 到 ADP 的循环步骤，但是由于 ADP 不是一种独立的代谢物，因此这对分析并没有影响）。第一眼就看出，这好像是一个推导核心矩阵（见表 12.5）的一个直截了当的练习，即根据 12.2.2 节中介绍的方法通过逆向工作和对每种代谢物进行平衡来直接推导出核心矩阵，但是，和能量相联系的反应之间的相互依赖引入了一些附加的棘手的问题。

表 12.4 氨基酸生物合成网络的 SIMS 矩阵

种　类	反								应									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18
Glc	1	−1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
G6P	0	1	−1	−1	0	0	0	0	−1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
FDP	0	0	0	1	−0.5	0	−0.5	0	−0.5	0	0	0	0	0.5	0.5	0	0	0
PEP	0	0	0	0	1	−1	0	0	−1	−1	0	0	0	−1	0	0	0	0
ATP	0	−1	−1	−1	1	1	0	−1	0	−1	0	−1	−1	−4	1	0	0	0
DAHP	0	0	0	0	0	0	0	0	1	−1	0	0	0	0	0	0	0	0
CHR	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	−1	0	0	−1	0	0	0	0
PPH	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	−1	−1	0	0	0	0	0
X5P	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	−1	−1	0	0	0
Phe	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	−1	0	0
Tyr	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	−1	0
Trp	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	−1
ADP	0	1	1	1	−1	−1	0	1	0	1	0	1	1	4	−1	0	0	0

注：反应序号与图 12.1 中的反应相对应。

表 12.5　氨基酸生物合成网络的 SIMS 矩阵中的核心矩阵

反　应②	独立途径①					
	P1 Trp	P2 Phe	P3 Tyr	P4 Pol	P5 Gol	P6 ADP
1	5.5	3	3	2	1	0.5
2	5.5	3	3	2	1	0.5
3	0	0	0	1	0	0
4	4.5	2	2	1	1	0.5
5	9	4	4	2	1	1
6	6	2	2	2	1	1
7	0	0	0	0	1	0
8	0	0	0	0	0	1
9	1	1	1	0	0	0
10	1	1	1	0	0	0
11	0	1	1	0	0	0
12	0	1	0	0	0	0
13	0	0	1	0	0	0
14	1	0	0	0	0	0
15	0	1	1	0	0	0
16	0	1	0	0	0	0
17	0	0	1	0	0	0
18	1	0	0	0	0	0

① 这些独立途径如图 12.7 所示，每一条独立途径的特征反应用黑体字和下划线表示。

② 反应序号与图 12.1 中的反应相对应。

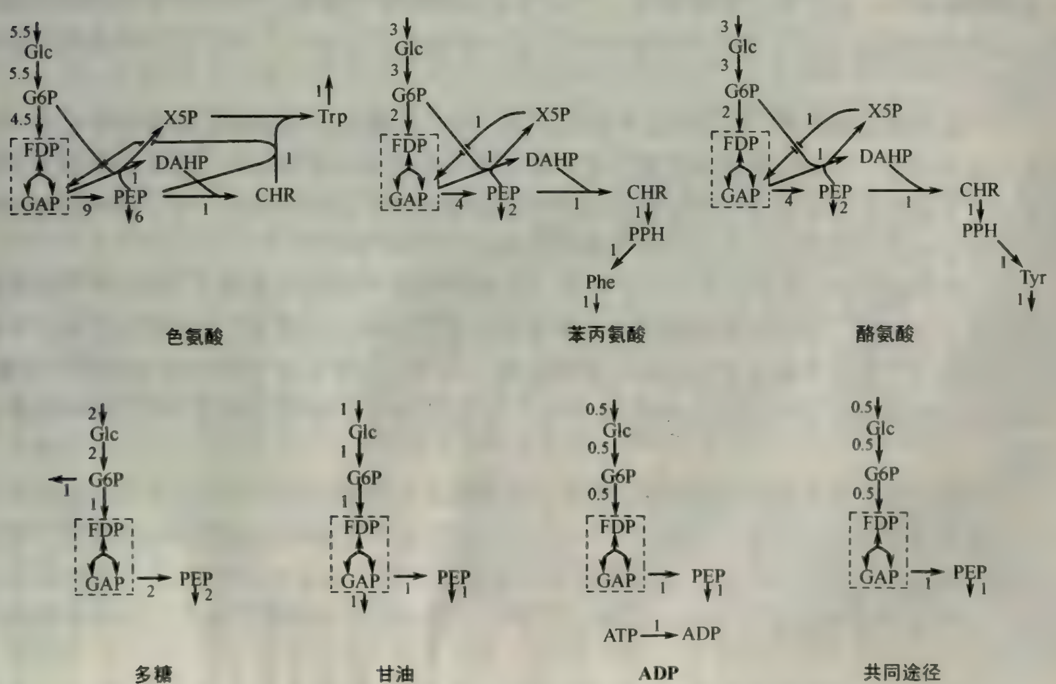


图 12.7　芳香族氨基酸生物合成网络中的独立途径

如图所示：有六条和六种产物相联系的独立途径。流经每条途径的平衡后的通量被作为核心矩阵中相应途径的表列值。流经产能的糖酵解途径的相对通量也被确定了，糖酵解途径是所有六条独立途径的共同途径

例如，考虑由反应 1、2 和反应 3 组成的生成多糖（Pol）的途径。从图 12.1 中可以看出反应 1 和反应 2 应当平衡由反应 3 所消耗的 6-磷酸葡萄糖（G6P），因此仅仅从图 12.1 所示的碳转化的观点来考虑，这三步反应应该完成核心矩阵中代表多糖途径（途径 4）的列。但是检查表 12.5 所示的核心矩阵中的第四列显示出对这条途径来说还有另外的表列值。与这些表列值相对应的反应也必须被包括以便与反应 1、2 和反应 3 一起使 ATP（和通过扩展，包括 ADP）的平衡完全闭合。当发生这种情况时，在这个网络能提供被任何反应所需要的 ATP 的惟一方法是通过以反应 6 为终点的糖酵解途径。这样，多糖途径的完成需要再加上反应 1、2、4，以及等价于反应 5 和反应 6 的反应。如果每一个其它的输出步骤都遵从同样的过程，所得结果将是如表 12.5 所示的核心矩阵。这个核心矩阵也可通过使用前面确定的 6 个输出步骤作为基，求解式（12.8）来建立。图 12.7 提供了核心矩阵中所识别的每一条途径所平衡的通量的图示。如图 12.7 所示，糖酵解途径的 ATP 生成途径被所有 6 条独立途径所利用。

12.3.3 连接代谢物的识别和组通量确定

在上一节中，确定了图 12.1 所示的芳香族氨基酸的生物合成网络包括 6 条独立途径。这当然也暗示着网络中包含几个分支点，为了生成不同的终产物，在分支点处途径发生了分岔。在这里，证明示范一种分支点定位的正式程序步骤，它一般可应用于具有任何复杂性的网络。该程序以独立途径的确定开始（如图 12.7 所示）（其正如核心矩阵所定义的），然后按照下述步骤继续进行。

(1) 识别由核心矩阵所限定的独立途径中的最大的共同反应组（即最长的共同途径）。已经表明对于芳香族氨基酸生物合成网络的 6 条独立途径（见图 12.7）来说，这条共同途径是糖酵解途径。它产生了网络中第一个分支点处的连接代谢物。对于作为实例研究的网络，这个代谢物是 ATP。参与共同途径的反应一起组成反应组 A，该反应组在连接代谢物的上游。

(2) 在该共同途径中，识别生成产物的步骤，这一步骤负责该连接代谢物的净生成。改变核心矩阵中每一列的比例使得代表生成产物步骤的所有表列值都相等。平衡共同途径中的任何其它反应使得在这条途径中没有任何中间代谢物的净生成或净消耗。对于实例研究的网络，平衡后的共同途径中反应的化学计量关系如图 12.7 所示。

(3) 将原始的核心矩阵分为三个子矩阵（由此产生三个组核心矩阵），每一个子矩阵都包括该组中的反应。因为由先前识别的共同途径组成了上游反应组 A，将共同途径的已平衡的反应的化学计量系数输进它的组核心矩阵的每一列中，而所有其它反应的表列值记为零。从原始核心矩阵减去这个组核心矩阵以产生一个包括两个下游反应组 B 和 C 的减缩核心矩阵。

(4) 确定包含尽可能多的减缩核心矩阵的途径的最大共同反应组（即，一条新的共同途径，其将被用于确定反应组 C 中的下一个分支点）。分成一个新的下游组核心矩阵 B，它的这些列（即途径）中的表列值不包括新的共同途径的反应。从组核心矩阵 A 的表列值减去组核心矩阵 B 的表列值就可以得到组核心矩阵 C。反应组 C 中的所有途径包括这条新的共同途径。

(5) 对于任何在两列或更多列中有表列值的下游反应组（B 或 C），重复步骤(1)～步骤(4)以便依次识别每一个连接代谢物。注意到反应组 C 中的共同途径在步骤（4）中已经被确定了。相应于这条共同途径的组核心矩阵为新的连接代谢物限定了组 L，因为它包括将新

的连接代谢物同以前的连接代谢物相连接的那些反应。然而，这个连接代谢物上游整个反应组 A 包括反应组 L、先前的连接代谢物上游的反应组 A 及在先前的连接代谢物处从该新共同途径分岔出的反应组（B 或 C）。结果，网络中的每一步都将被围绕任何连接代谢物的三个反应组（A、B 和 C）之一所说明。正如后面所讨论的，组 A 和组 L 的分别考虑对于组通量和组控制系数的适当确定是必要的。

(6) 重复上述程序步骤直到没有更多的共同途径能被识别。此时，最后的下游反应组每组将仅由表列值不为零的单列组成。用这种方式所识别的分支点数等于 $P-1$，这里 P 是独立途径的数。

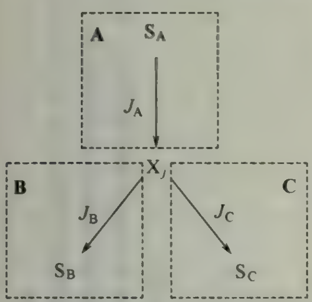


图 12.8　分支点及围绕分支点所定义的反应组和代谢通量的一般表示
反应组 A、B 和反应组 C 包括该分支点代谢物的上游和下游中的所有网络反应

应该注意，这个程序的最终目的是寻找一个代谢网络中的分支点的位置，并合理地确定围绕每一个分支点的反应组及其相应的通量。在图 12.8 中对此进行了图解表示：分支点代谢物 X_j 和围绕 X_j 形成的三个反应组 A、B 和 C。正如在第 13 章中用公式所表示的那样，这些反应组的组控制系数可以从围绕分支点代谢物的三个通量 J_A、J_B 和 J_C 来确定。正确地计算这些通量将确保相应的组控制系数正确的确定。

通过重复应用核心矩阵和组核心矩阵，该程序对实例研究的应用证明示范如下。这些重复的前两个已在图 12.9 和图 12.10 中以图示说明。注意，为了使组通量容易确定，原始的核心矩阵（表 12.5）中补充了两个新行。其中第一行是这样一行，其在随后将与每一列的其他表列值一起被改变比例。第二个新行仅仅表明每一条独立途径中的特征通量而且它们不需要改变比例。

分支点 1 —— ATP

(1) 对表 12.5 中核心矩阵中的列进行检查显示最长的共同途径是糖酵解途径，它包括反应 1、2、4、5 和反应 6。这条途径的终端代谢物 ATP 因而被识别为这个网络中的第一个连接代谢物（从图 12.7 的途径中也可以看出这一点）。

(2) 这条共同途径中生成产物的步骤是反应 6，它负责 ATP 的净生成，因为在反应 2、4 和反应 5 中 ATP 的生成和消耗相互抵消了。因此，核心矩阵中的列必须相对于反应 6 改变比例。将核心矩阵中的第二列的表列值乘以 3 后，代表反应 6 的表列值变为 6。核心矩阵中其它每一列的表列值都类似地乘以适当的因子以使它们代表反应 6 的表列值都等于 6。改变比例后的矩阵如图 12.9 所示，方框内表示了所有 6 条途径的共同反应。为了确保这条共同途径中没有中间代谢物形成，其剩余的反应必须被平衡，如图 12.7 中的最后一幅图所示。这种需要对于确立通过每一个反应组的正确的通量是很重要的，对此将在以后作更详细的讨论。

(3) 形成 ATP 的平衡了的化学计量反应一起被汇聚进 ATP 上游的组 A，产生的组核心矩阵如图 12.9 所示。组核心矩阵（A）中的每一列都包括经过平衡的糖酵解途径（P6）的拷贝。应注意，反应 1、2、4 和反应 5 的表列值和改变了比例的矩阵中的六列值的不同，并且这些通量仅有一部分被包括在组 A 的通量中。实际上，仅仅通过直接归因于 ATP 的形成的这四个步骤的那部分通量被包括在组 A 中。通过这些步骤的通量的剩余部分与碳代谢物有关，并围绕其它分支点而被分布。

(4) 共同途径的矩阵（即组核心矩阵 A）减去之后剩余的改变了比例的核心矩阵部分是一个仅仅由包括在下游反应组的反应所构成的减缩核心矩阵。从这个减缩核心矩阵中可以得

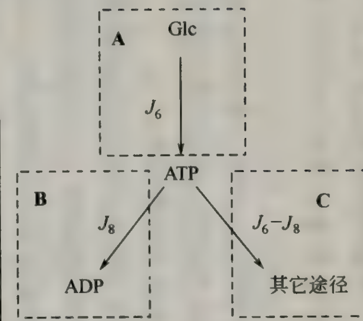
反应	P1 Trp	P2 Phe	P3 Tyr	P4 Pol	P5 Gol	P6 ADP
1	5.5	3	3	2	1	0.5
2	5.5	3	3	2	1	0.5
3	0	0	0	1	0	0
4	4.5	2	2	1	1	0.5
5	9	4	4	2	1	1
6	6	2	2	2	1	1
7	0	0	0	0	1	0
8	0	0	0	0	0	1
比例因子	1	1	1	1	1	1
特征通量	J_{18}	J_{16}	J_{17}	J_3	J_7	J_8

原始核心

(1)~(2)

反应	P1 Trp	P2 Phe	P3 Tyr	P4 Pol	P5 Gol	P6 ADP
1	5.5	9	9	6	6	3
2	5.5	9	9	6	6	3
3	0	0	0	3	0	0
4	4.5	6	6	3	6	3
5	9	12	12	6	6	6
6	●	●	●	●	●	●
7	0	0	0	0	6	0
8	0	0	0	0	0	6
比例因子	1	3	3	3	6	6
特征通量	J_{18}	J_{16}	J_{17}	J_3	J_7	J_8

缩能核心



(3)~(4)

反应	P1 Trp	P2 Phe	P3 Tyr	P4 Pol	P5 Gol	P6 ADP
1	3	3	3	3	3	3
2	3	3	3	3	3	3
3	0	0	0	0	0	0
4	3	3	3	3	3	3
5	6	6	6	6	6	6
6	6	6	6	6	6	6
7	0	0	0	0	6	0
8	0	0	0	0	0	6
比例因子	1	3	3	3	6	6
特征通量	J_{18}	J_{16}	J_{17}	J_3	J_7	J_8

A

+

反应	P1 Trp	P2 Phe	P3 Tyr	P4 Pol	P5 Gol	P6 ADP
1	0	0	0	0	0	0
2	0	0	0	0	0	0
3	0	0	0	0	0	0
4	0	0	0	0	0	0
5	0	0	0	0	0	0
6	0	0	0	0	0	0
7	0	0	0	0	0	0
8	0	0	0	0	0	6
比例因子	1	3	3	3	6	6
特征通量	J_{18}	J_{16}	J_{17}	J_3	J_7	J_8

B

组核心

+

反应	P1 Trp	P2 Phe	P3 Tyr	P4 Pol	P5 Gol	P6 ADP
1	2.5	6	6	3	3	0
2	2.5	6	6	3	3	0
3	0	0	0	3	0	0
4	1.5	3	3	0	3	0
5	3	6	6	0	0	0
6	0	0	0	0	0	0
7	0	0	0	0	6	0
8	0	0	0	0	0	0
比例因子	1	3	3	3	6	6
特征通量	J_{18}	J_{16}	J_{17}	J_3	J_7	J_8

C

图 12.9　在 ATP 分支点处核心矩阵的比例改变和划分的图示

(1)确定共同途径(反应 1～2 和反应 4～6)和连接代谢物(ATP)。(2)将原始核心矩阵相对于共同途径中产物生成反应(反应 6)进行比例改变以产生一个改变了比例的核心矩阵(只显示了前八行)。(3)在核心矩阵 A 的所有列中复制平衡后共同途径的表列值形成反应组 A 的组核心。从改变了比例的矩阵中减去这些表列值形成一个下游的减缩核心矩阵，它是反应组 B 和反应组 C 的组核心矩阵的和。(4)反应 1 和反应 2 被确定为五条下游途径中的共有反应。这些途径共同组成反应组 C,其余的下游反应构成反应组 B。用一个略图表示了这个分支点及其组通量以供参考

反应	P1 Trp	P2 Phe	P3 Tyr	P4 Pol	P5 Gol
1	2.5	6	6	3	3
2	2.5	6	6	3	3
3	0	0	0	3	0
4	1.5	3	3	0	3
5	3	6	6	0	0
6	0	0	0	0	0
7	0	0	0	0	6
8	0	0	0	0	0
比例因子	1	3	3	3	6
特征通量	J_{18}	J_{16}	J_{17}	J_3	J_7

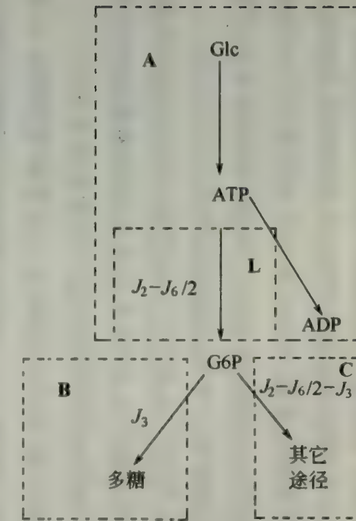
原始核心

(1)~(2) →

反应	P1 Trp	P2 Phe	P3 Tyr	P4 Pol	P5 Gol
1	6	6	6	6	6
2	6	6	6	6	6
3	0	0	0	6	0
4	3.6	3	3	0	6
5	7.2	6	6	0	0
6	0	0	0	0	0
7	0	0	0	0	12
8	0	0	0	0	0
比例因子	2.4	3	3	6	12
特征通量	J_{18}	J_{16}	J_{17}	J_3	J_7

缩能核心

(3)~(4)



反应	P1 Trp	P2 Phe	P3 Tyr	P5 Gol	P4 Pol
1	6	6	6	6	6
2	6	6	6	6	6
3	0	0	0	0	0
4	0	0	0	0	0
5	0	0	0	0	0
6	0	0	0	0	0
7	0	0	0	0	0
8	0	0	0	0	0
比例因子	2.4	3	3	12	6
特征通量	J_{18}	J_{16}	J_{17}	J_7	J_3

L

+

反应	P1 Trp	P2 Phe	P3 Tyr	P5 Gol	P4 Pol
1	0	0	0	0	0
2	0	0	0	0	0
3	0	0	0	0	6
4	0	0	0	0	0
5	0	0	0	0	0
6	0	0	0	0	0
7	0	0	0	0	0
8	0	0	0	0	0
比例因子	2.4	3	3	12	6
特征通量	J_{18}	J_{16}	J_{17}	J_7	J_3

B

+

反应	P1 Trp	P2 Phe	P3 Tyr	P5 Gol	P4 Pol
1	0	0	0	0	0
2	0	0	0	0	0
3	0	0	0	0	0
4	3.6	3	3	6	0
5	7.2	6	6	0	0
6	0	0	0	0	0
7	0	0	0	12	0
8	0	0	0	0	0
比例因子	2.4	3	3	12	6
特征通量	J_{18}	J_{16}	J_{17}	J_7	J_3

C

组核心

图 12.10　在 G6P 分支点处对核心矩阵的比例改变和分割的图示

(1) 初始核心中，也就是 ATP 分支点的反应组 C 的组核心（见图 12.9）中确定了平衡的共同途径（反应 1~2）和连接代谢物（G6P)。(2) 将初始核心对共同途径的产物生成步骤进行适当比例改变得到改变了比例的核心（仅显示了前 8 行)。(3) 将平衡的共同途径的输入值复制到核心 A 的所有列中形成反应组 L 的组核心。从改变了比例的核心中减去这些输入值后得到一个下游减缩核心，它等于反应组 B 和反应组 C 的组核心之和。(4) 反应 1 和反应 2 是四条独立途径的共有反应，这四条独立途径构成新的反应组 C，剩余的下游途径构成反应组 B。图中表示了这个分支点 G6P 和它周围的组通量以及它和 ATP 分支点的关系。注意反应组 L 只是 G6P 分支点的反应组 A 的一部分，G6P 分支点的反应组 A 还包括分支点 ATP 的反应组 A 和反应组 B

到两个下游反应组 B 和反应组 C 的构成如下：检查减缩核心矩阵后显示反应 1 和反应 2 对前 5 个独立途径的是共同的，但对第六个不是。这样，反应 1 和反应 2 就组成了新的共同途径，而反应 8 是减缩核心矩阵中独立途径 P6 的惟一表列值。相应地，独立途径 P6 中的这个剩余反应（即反应 8）就构成了反应组 B，而由减缩核心矩阵中前 5 个独立途径所表示的网络反应的剩余者就构成了反应组 C。所有三个组的构成如图 12.9 中的组核心矩阵所示。认识到这一点很重要：如果将这三个核心矩阵加起来就是改变了比例的核心矩阵，而这三个核心矩阵就是从它导出的。这样就确定了围绕第一个连接代谢物 ATP 的所有三个反应组的构成。

（5）在上述（4）中所识别的新的共同途径（反应 1 和反应 2）将用在下面的讨论中以识别反应组 C 中的剩余的分支点。下一个分支点上游的反应组 A 不仅仅包括这条新的共同途径，还包括这里所识别的反应组 A 和反应组 B，它们已经从反应组 C 中被分离出来。

在这个网络中要识别的第一个连接代谢物确实是 ATP，理解这一点是很关键的。从图 12.1 的反应图示中不能立刻明白这个事实，因为绘制图 12.1 是为了描绘碳代谢物之间的转换。然而，通过糖酵解途径生成 ATP 是所有独立途径的共有特点。本质上，通过每一条独立途径的总通量等于由生成相应的末端代谢物所需的碳通量和这条途径中生成所消耗的 ATP 所需的通量的总和。因为随后每一条独立途径以不同的方式利用 ATP，所以围绕连接代谢物 ATP 进行的反应组分别代表了通过糖酵解途径生物化学能量的净生成以及由所有的能量消耗反应（反应组 C）随后对 ATP 的利用。反应组 B 代表了将所剩余的 ATP 水解成为 ADP 以为维持或无效循环 ATP 的使用。

实际上，通过共同途径生成全部 ATP 而消耗的这一部分葡萄糖通量可以被认为是归并进一个单一的库。剩余的和碳代谢有关的葡萄糖通量被分布在途径 1～5 中，共同的 ATP 库能够满足这些途径对能量的额外需求。另外，必须强调的是，按照碳代谢结构图所进行的不适当的反应分组，而且没有把 ATP 作为一种连接代谢物来识别，如果不是完全无能得到这些估计的话，这种做法事实上将导致对控制系数的估计明显的不准确。在处理任何其它连接代谢物（如 NADH）或与生长相关的通量要扩大时（这种情况破坏了标准的反应图示），必须遵循这种分离相联通量的相同程序步骤。

在识别第一个连接代谢物和反应组之后，剩下的工作就是确定每一个反应组的实际通量。注意，这些通量的单位应当是分支点代谢物的摩尔量/[单位时间 × 单位细胞]。就反应组 B 来说，显然组通量是通过反应 8 的通量。类似地，反应组 A 的通量等于反应 6 的反应速率，该反应负责 ATP 的净生成。因为 ATP 被反应组 C 中的很多步骤所消耗，因此反应组 C 的通量是通过加和所有这些步骤对通量的贡献来确定。这个通量也等于通过反应组 A 和反应组 B 的通量之间的差。

通过核心矩阵的直接应用可以更严密地求得这些组通量。回想到依据式（12.8），通过任何反应的总通量等于通过可归因于每个独立途径的反应的通量之和。这个方程式也表明，通过经任何反应的通量能够从定义核心矩阵的基的特征反应的通量得到。这就是要在上述的核心矩阵中补充相应于特征通量的行的目的。通过用此信息，就可以通过以下的程序来精确地确定组通量。

（1）确定反应组 N（即反应组 A、B 或反应组 C）中的负责连接代谢物的净生成或净消耗的反应 i。对于反应组 A 来说这个反应会是反应 6，对于反应组 B 来说这个反应会是反应 8。

（2）对于反应组 N 所包含的每一条途径 P_j，用那一列的改变了比例的表列值除组核心矩阵中的表列值 K_{ij}，并乘以通过相应于途径 P_j 的特征反应的通量。如果在 SIMS 矩阵中反

应 i 的化学计量式并没有产生连接代谢物的一个等价物，则将产生的通量乘以合适的化学计量系数。此结果将是通过归因于途径 P_j 的反应组 N 的通量，其单位是所形成的连接代谢物的摩尔量/单位时间。

(3) 将程序 2 中得到的通过反应组 N 中所有途径的通量加和起来以得到总的组通量。

(4) 对剩下的每个反应组重复前面的程序。以另外的方式，以得到各自的组通量，通过最后一个反应组的通量还可以从其它反应组的通量平衡求得。

因为核心矩阵中的所有六个列（即全部六条独立途径）都贡献于反应组 A，所以从反应组 A 流入 ATP 的通量（即 ATP 生成的净通量）等于可归因于所有途径的反应 6 的通量。这当然也是通过反应 6 的总通量，而且两种结果都如式（12.10）所示。在反应组 B 中消耗 ATP 的反应是反应 8，它也是反应组 B 中的惟一反应。因此，反应组 B 的通量等于（6/6）J_8，或者简单说就是 J_8。因为在反应组 C 中相应于 ATP 净消耗的反应不是容易弄明白的，它的组通量可以最容易地通过其它两个组通量的差值来求出。根据这个讨论，围绕分支点 ATP 来自上游反应组（A）流入下游反应组（B 和 C）的通量如下式所示：

$$\begin{aligned} {}_{\mathrm{ATP}}^{*}J_{\mathrm{A}} &= 6J_{18}+2J_{16}+2J_{17}+2J_3+J_7+J_8=J_6 \\ {}_{\mathrm{ATP}}^{*}J_{\mathrm{B}} &= J_8 \\ {}_{\mathrm{ATP}}^{*}J_{\mathrm{C}} &= 6J_{18}+2J_{16}+2J_{17}+2J_3+J_7=J_6-J_8 \end{aligned} \tag{12.10}$$

分支点 2 —— G6P

分支点分析的第二次重复以反应组 C 的核心矩阵作为起点。注意到，由于途径 P6 已经被分入一个独立的组，因此在这个核心矩阵中仅有表列值零，在这个反应组的分析中可以忽略不计。因此，如图 12.10 所示的初始核心矩阵含有来自图 12.9 所示的反应组 C 的组核心矩阵中的前五列。将用这个核心矩阵来确定围绕此新分支点的反应组 L、B 和反应组 C。然而，如图 12.10 所示，这个分支点的整个上游反应组 A 除了包括除这里所识别的反应组 L 外，还将包括分支点 ATP 的反应组 A 和反应组 B。这样，反应组 A 的组核心矩阵将是这三个反应组的组核心矩阵之和。为了确保实际网络中的每一个反应都被包含在围绕这个连接代谢物的所有反应组中的一个反应组之中，这个说明是有必要的。

第二个分支点的分析继续进行如下。

(1) 检查反应组 C 的组核心矩阵表明反应 1 和反应 2 构成为剩下的途径 P1 ～ P5 所共同的最长的途径，作为这条共同途径终端代谢物的 G6P 就被识别为下一个分支点。

(2) 反应 2 被识别为这个分支点代谢物的生成步骤。因此，该矩阵的每一列都相对于反应 2 而被改变比例，正如图 12.10 所示。反应 1 和反应 2 在这条途径中已经按照 1∶1 的比例被平衡。

(3) 将平衡后的共同途径的化学计量系数 6∶6 复制到每一列中形成反应组 L 的组核心矩阵，从而导致途径 P1～P5 中反应 1 和反应 2 的表列值均为 6。从改变了比例的核心矩阵中减去核心矩阵 L 导致在下游减缩矩阵中反应 1 和反应 2 的表列值为 0。因此通过这两个步骤的通量的剩余部分实际上被认为存在于反应组 L 内（会想到对于分支点 G6P，反应组 A 除了包括反应组 L 外，还包括分支点 ATP 的反应组 A 和反应组 B）。

(4) 检查下游减缩矩阵（减去核心矩阵 L 后形成的）显示反应 4 是 4 条途径 P1～P3 和 P5 惟一的共同步骤。因此反应 4 就是新的共同途径，而反应 3 是在减缩核心矩阵中途径 4 的惟一表列值。相应地，反应 3 构成了新的反应组 B，而剩下的 G6P 的下游代谢反应构成了新的反应组 C。所产生的组核心矩阵如图 12.10 所示，为了更清楚地表示，将代表 P4 和

P5 的列进行了重排。

(5) 在下面的讨论中，在上述步骤 4 中被识别的新的共同途径（反应 4）将用来确定反应组 C 中剩余的分支点。下一个分支点的上游反应组 A 将不仅包括这个共同途径，还包括从反应组 C 中已经分离出来的 G6P 分支点的反应组 A 和反应组 B。

从其上游分支途径 A 流入 G6P 分支点的通量等于通过反应 2 的与碳代谢相联系的通量。这个通量既可以通过先前描述过的矩阵检查的方法来确定，或者从通过反应 2 的总通量中减去与能量代谢相联系的通量而确定。化学计量式表明：通过反应 2 的与能量代谢相联系的通量一定等于通过反应 6 的总通量的一半。因此有

$$
\begin{aligned}
{}_{G6P}^{*}J_A &= \frac{5}{2}J_{18} + 2J_{16} + 2J_{17} + J_3 + \frac{1}{2}J_7 = J_2 - \frac{1}{2}J_6 \\
{}_{G6P}^{*}J_B &= J_3 \\
{}_{G6P}^{*}J_C &= \frac{5}{2}J_{18} + 2J_{16} + 2J_{17} + \frac{1}{2}J_7 = J_2 - \frac{1}{2}J_6 - J_3
\end{aligned}
\qquad (12.11)
$$

分支点 3 —— FDP/GAP

(1) 在分支点 G6P 的反应组 C 中惟一与剩下的途径所共用的步骤是反应 4，其将 G6P 转化成为 1,6-二磷酸果糖（FDP）。因此，FDP 可被识别为第三个分支点。注意：由于在这个模型中 FDP 被认为是与 3-磷酸甘油醛（GAP）保持平衡的，所以这个分支点实际上是 FDP 和 FDP 复合库，它们之中的任何一个都可以作为连接代谢物。

(2) 由于反应 4 是共同途径中的惟一反应，显然它也就是产物生成步骤。如果这个核心矩阵中其余四列相对于这一列被改变比例，则改变了比例的核心矩阵如下：

反　　应	P1 Trp	P2 Phe	P4 Tyr	P5 Gol
1	0	0	0	0
2	0	0	0	0
3	0	0	0	0
4	3	3	3	3
5	6	6	6	0
6	0	0	0	0
7	0	0	0	6
8	0	0	0	0
9	2	3	3	0
10	2	3	3	0
⋮	⋮	⋮	⋮	⋮
比例因子	2	3	3	6
特征通量	J_{18}	J_{16}	J_{17}	J_7

(3) 将改变了比例的矩阵中第四行的表列值复制到每一列中，并使其余的表列值全部为零就形成了反应组 L 的核心矩阵。这个分支点的反应组 A，同前述的一样，是从这个组加到先前的（G6P）分支点的反应组 A 和反应组 B 而形成的。当从改变了比例的核心矩阵中减去核心矩阵 L，得到下游减缩矩阵，它包含着改变了比例的核心矩阵的所有第四行以下的所有表列值，其余的表列值全部为 0。

(4) 从下游减缩矩阵，可以很容易看出反应 5、9 和反应 10 是途径 P1、P2 和途径 P3 的共同途径。因为途径 P5 不含有这些步骤中的任何一个，它的列（即反应 7）中的剩余的表列值

被放进反应组 B。反应组 C 包含了前三条途径中的剩余反应，它的组核心矩阵包括了改变了比例的核心矩阵中的前三列从第五行开始的表列值，如改变了比例的矩阵中的方框所示。

(5) 分支 C 中的共同途径（反应 5、9 和反应 10）将随后用于确定下一个分支点。那个下游分支点的上游反应组 A 除了包括这条共同途径外，还包括这个（FDP/GAP）分支点的反应组 A 和反应组 B。

这些分支途径的通量很容易通过改变了比例的矩阵和与观测到的有关通量来求出。这样，分支途径 A 的通量就是通过反应 4 的与碳代谢相联系的通量。分支途径 B 的通量仅仅是通过反应 7 的通量的一半，因为这步反应仅消耗 1/2 当量 FDP。最后，通过分支途径 C 的通量可以通过其它两个通量的差值来确定。因此有：

$$
\begin{aligned}
{}_{\mathrm{FDP}}^{*}J_{\mathrm{A}} &= \frac{3}{2}J_{18}+J_{16}+J_{17}+\frac{1}{2}J_{7}=J_{4}-\frac{1}{2}J_{6} \\
{}_{\mathrm{FDP}}^{*}J_{\mathrm{B}} &= \frac{1}{2}J_{7} \\
{}_{\mathrm{FDP}}^{*}J_{\mathrm{C}} &= \frac{3}{2}J_{18}+J_{16}+J_{17}=J_{4}-\frac{1}{2}J_{6}-\frac{1}{2}J_{7}
\end{aligned}
\qquad (12.12)
$$

分支点 4 —— X5P + CHR

(1) 三个反应（5、9 和 10）是分支点 FDP/GAP 下游途径 P1～P3 的共同途径。如果对这些反应按照化学计量比例 2∶1∶1 进行平衡，则生成 5-磷酸木酮糖（X5P）和分支酸（CHR）而没有任何中间代谢物的净生成。因此，这是具有两个连接代谢物的一个分支点的不寻常的情况。但是，这并不是问题，因为在稳态条件下 X5P 和 CHP 总是必须一起被生成和消耗。

(2) 取决于连接代谢物的选择，共同途径的生产步骤是反应 9 或反应 10。由于在稳态下这两个步骤的通量是相当的，因此选择 X5P 或 CHP 都可以。任一选择都可以得到下面改变了比例的核心矩阵：

反　　应	P1 Trp	P2 Phe	P3 Tyr
5	3	2	2
6	0	0	0
7	0	0	0
8	0	0	0
9	1	1	1
10	1	1	1
11	0	1	1
12	0	1	0
13	0	0	1
14	1	0	0
15	0	1	1
16	0	1	0
17	0	0	1
18	1	0	0
比例因子	1	1	1
特征通量	J_{18}	J_{16}	J_{17}

(3) 将数值为 2、1 和 1 的表列值分别置入矩阵的第 5、9 和第 10 行可以得到在这个分

支点上游反应组 L 核心矩阵的三个列。从改变了比例的核心矩阵中减去组 L 后，得到如下一个下游减缩核心矩阵：

反　　应	P1 Trp	P2 Phe	P3 Tyr
5	1	0	0
6	0	0	0
7	0	0	0
8	0	0	0
9	0	0	0
10	0	0	0
11	0	1	1
12	0	1	0
13	0	0	1
14	1	0	0
15	0	1	1
16	0	1	0
17	0	0	1
18	1	0	0
比例因子	1	1	1
特征通量	J_{18}	J_{16}	J_{17}

(4) 可以看出在第五行有一个非零的表列值，这表明通过这个反应的剩余的一部分通量将包括在相应于途径 P1 的下游分支途径中。反应 5 的这一部分是由反应 14 所生成的 GAP 循环所需要的。从这个下游减缩核心矩阵或图 12.7 中可以明显地看出，色氨酸途径消耗这两种连接代谢物不同于其它两条途径。因此，反应组 B 由途径 P1 中的剩余反应构成，反应组 C 由途径 P2 和途径 P3 中的剩余反应构成，都使用反应 11 和反应 15。

(5) 分支途径 C 中的共同途径（反应 11 和反应 15）随后将被用于确定下一个分支点。这个下游分支点的上游反应组 A 将包括这两个步骤，此外还包括早些时候求出的反应组 A 和反应组 B。

以分支酸的一个单一等价物形式，从上游反应组流入这个分支点的通量等于反应 10 的通量。流入反应组 B 的通量等于反应 14，或等价地，等于反应 18 的通量。流入反应组 C 的通量显然是其它两个组通量的差值，而且也等于反应 11 的通量。因此这些通量可以用下式来表示：

$$\begin{aligned} {}_{X/C}^{*}J_A &= J_{18}+J_{16}+J_{17}=J_{10} \\ {}_{X/C}^{*}J_B &= J_{18}=J_{14} \\ {}_{X/C}^{*}J_C &= J_{16}+J_{17}=J_{11} \end{aligned} \tag{12.13}$$

分支点 5 —— PPH

(1) 为苯丙氨酸和酪氨酸两条合成途径（途径 P1 和途径 P2）所共用的两个其余步骤是反应 11 和反应 15。反应 15 仅仅是循环 1 当量未被利用的 X5P 返回到 GAP 分支点处，而反应 11 生成了最后分支点代谢物，预苯酸（PPH）。

(2) 显然反应 11 是这条途径的生产步骤。因为反应组 C 中的反应 11 和反应 15 的表列值已经被平衡过并且相等，因此没有必要再改变比例了。

(3) 反应组 L 由共同途径反应 11 和反应 15 构成。反应组 A 由这些反应以及包括在分支点 X5P + CHR 的反应组 A 和反应组 B 组成。当从核心矩阵中减去第 11 和第 15 行的表

列值后，得到一个仅有以下表列值的下游减缩矩阵：

反　　应	P2 Phe	P3 Tyr
12	1	0
13	0	1
14	0	0
15	0	0
16	1	0
17	0	1
18	0	0
比例因子	1	1
特征通量	J_{16}	J_{17}

(4) 因为在这两条途径（P2 和 P3）中已经没有更进一步的共同特征，每条途径中的剩余反应被分成两个下游反应组。分支途径 B 包括反应 12 和反应 16，其生成苯丙氨酸，而分支途径 C 是由专用于酪氨酸的途径——反应 13 和反应 17 所构成。反应 12 和反应 13 分别是这些反应组的消耗步骤。

围绕预苯酸分支点的通量的确定当然是这个系统中最简单的。来自上游分支（A）的通量是反应 11 的通量，而下游分支途径的通量等于通过这些反应中任何一个的通量。因此，围绕这个分支点的通量如下所示：

$$
\begin{aligned}
{}_{\mathrm{PPH}}^{*}J_{\mathrm{A}} &= J_{16}+J_{17}=J_{11}\\
{}_{\mathrm{PPH}}^{*}J_{\mathrm{B}} &= J_{16}=J_{12}\\
{}_{\mathrm{PPH}}^{*}J_{\mathrm{C}} &= J_{17}=J_{13}
\end{aligned}
\tag{12.14}
$$

由上述的程序所识别的分支结构如图 12.11 所示。从这张表示与碳-代谢相关通量及能量-代谢相关通量的图应当清楚看出，这个代谢网络包括一系列分叉的分支点；每一条独立途径都与一种由一个输出步骤形成的分泌产物相联系。对这些所分泌的代谢物的积累的测定以及其它副产物（在这个例子中是 CO_2 和乙醇）的测定，为用第 8 章～第 10 章中所介绍的方法来估计通过每一条独立途径的通量提供了方法手段。此外，用第13章开始部分所介绍

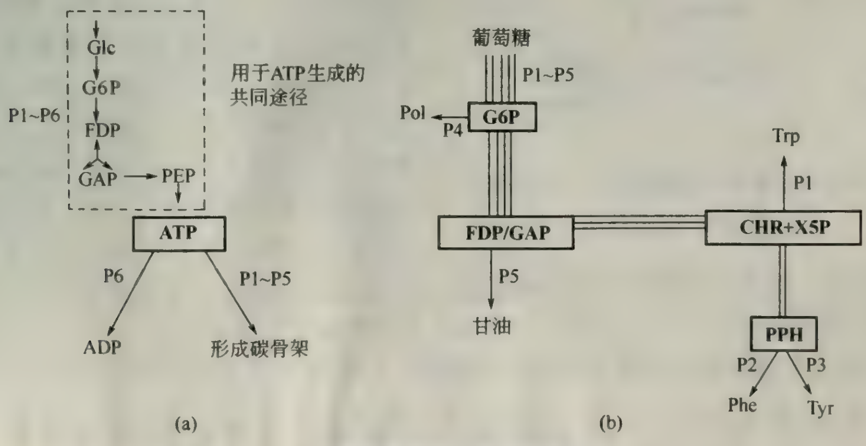


图 12.11　芳香族氨基酸生物合成网络的分支点

系统的五个分支点及独立途径如图所示。(a) 和能量有关的分支点满足了生成产物的途径 P1～P5 和途径 P6 对 ATP 的过量需求；(b) 四个下游分支点将五条独立途径分离

的方法，在发酵过程的不同阶段或响应于所诱导的扰动所引起的这些积累物的变化可以用于定量评价由每一个反应组所施加的动力学控制。第 13 章中将从讨论对组控制系数的理论推导和依据通量估算值对它们进行计算的方法开始，接着将介绍通过重叠反应组的分析来确定单个控制系数的程序。最后将说明如何用这一章所识别的分支点来确定 *S. cerevisiae* 研究实例中的控制结构，以及如何将它们的相应的反应组用作对该网络的控制结构进行详细检验的基础。

参 考 文 献

Brown, C., Hafner, R. P., & Brand, M. D. (1990). A "top-down" approach to determination of control coefficients in metabolic control theory. *European Journal of Biochemistry* **188**; 321-325.

Galazzo, J. L. & Bailey, J. E. (1990). Fermentation pathway kinetics and metabolic flux control in suspended and immobilized *Saccharomyces cerevisiae*. *Enzyme and Microbial Technology* **12**; 162-172.

Galazzo, J. L. & Bailey, J. E. (1991). Errata. *Enzyme and Microbial Technology* **13**; 363.

Kacser, H. & Burns, J. A. (1973). The control of flux. *Symposia of the Society for Experimental Biology* **27**; 65-104.

Reder, C. (1988). Metabolic control theory: a structural approach. *Journal of Theoretical Biology* **135**; 175-201.

Simpson, T. W., Colón, G. E., & Stephanopoulos, G. (1995). Two paradigms of metabolic engineering applied to amino acid biosynthesis. *Biochemical Society Transactions* **23**; 381-387.

Stephanopoulos, G. & Simpson, T. W. (1997). Flux amplification in complex metabolic networks. *Chemical Engineering Science* **52**; 2607-2627.

第 13 章　代谢网络的通量分析

借助于加和定理，控制系数是可加的。因此，有可能把一个代谢物上游或下游的任何数目的反应看成是一个单一步骤。事实上，当存在于一条未分支途径内的反应不能轻易地通过实验互相区分时，这种反应集总常常是必要的。例如，在我们的 *S.cerevisiae* 实例研究中，这种邻近反应的分组得到广泛的实施，并帮助减少所考虑的单个反应的数目大约一个数量级。分组对网络控制结构确定的影响是最小的，因为按定义接近平衡的反应具有很小的控制系数。因此，把它们添加到局部速率控制步骤的控制系数上，仅能最小限度地影响后者的数值大小。

更重要的是，有可能把反应网络分成少量的反应组，正如在第 12 章说明的。严格地讲，只有当一个系统具有一个可识别的连接代谢物，这种分配才是可适用的，而这种连接代谢物是惟一的渠道，通过它，其它不同的途径或过程被连接起来。然而，正如在前一章中所描述的，由于反应组的构成，有可能形成反应组并确定连接代谢物，即使组之间或参与多个组的单个反应之间的相互作用存在。在 13.6 节里，我们会再考虑这一点。在这里，我们还注意到，这种反应分组有利于在具有很大组控制系数的反应组内，通过缩小搜寻进行关键反应步骤的识别。

在 13.1 节和 13.2 节，介绍了确定组控制系数的两种不同方法。在 13.1 节，严格定义了单个控制系数与组控制系数之间的关系。当单个 FCCs 可以利用时，这些关系允许对 gFCCs 进行确定。这个过程称为自下而上（bottom-up）法，在 13.3 节中通过实例研究对其进行了说明，组控制系数是通过动力学模型确定的。13.2 节引入了一种方法，该方法利用实验通量测量确定组控制系数。通过适当地比较这些组控制系数，就能得到单个控制系数（13.4 节），这种方法因此被称为自上而下（top-down）法。这两种方法的结果在 13.3 节的实例研究中进行了比较。图 13.1 以框图的形式对这两种方法进行了说明。

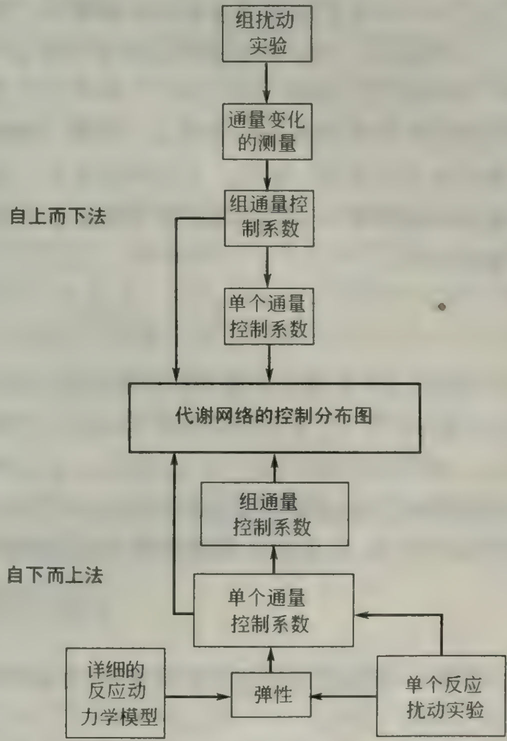


图 13.1　用自上而下法或自下而上法确定控制分布的信息流示意

13.1　组控制系数与单个控制系数之间的关系（自下而上法）

从数学方面讲，对于包含多个步骤的反应组 N 对通量 J_k 的影响的 gFCC（组通量控制系数）等于这些步骤对相同通量 J_k 影响的单个 FCC 之总和：

$$^{*}C_N^{J_k}=\sum_{i\in N}C_i^{J_k}\qquad k\in\{1,2,\cdots,L\}\tag{13.1}$$

通常 gFCC 的下标是代表一个明确定义的反应组的大写字母，而单个 FCC 的下标是单个步骤的序号。另外，因为反应组可以围绕不同的连接代谢物进行描述，如上一章所述，上述下标可以用来表示连接代谢物。对之，反应组已被定义。

组浓度控制系数（gCCCs）也满足类似的加和关系，因此，反应组 N 对代谢物 X_j 的影响：

$$^{*}C_N^{X_j}=\sum_{i\in N}C_i^{X_j}\qquad j\in\{1,2,\cdots,K\}\tag{13.2}$$

注意到，组控制系数有效地服从 MCA 原则，就如同它们就是单个反应的控制系数一样。同单个反应的 FCC 类似，gFCC 表示一组反应对一特定通量所施控制的程度。例如，如果已经确定出组控制系数 $^{*}C_N^{X_j}$ 较小，就可以得出这样的结论：组 N 中各反应变化的共同影响也是小的。推而广之，组内单个反应的影响通常可认为是同样的小，不过，如果在组 N 内某些反应对一个通量施加很强的相反的影响，情况就不会严格地是这样。

当系统内一个单个反应的通量被分配进围绕两个（或多个）分支点形成的两个（或多个）不同的反应组时，式（13.1）和式（13.2）会出现特殊的情况。回忆一下，这种情况在氨基酸生产的实例研究中出现过，例如，糖酵解反应是围绕 ATP、G6P 及 FDP 分支点的上游和下游反应组的一部分。在这种情况下，应该被添加到特定组控制系数中的一个反应的控制系数的部分等于通过起因于那个反应组的该反应的通量的分数，因此，式（13.1）可更一般地重写为：

$$^{*}C_N^{J_k}=\sum_{i\in N}\phi_i^N C_i^{J_k}\qquad k\in\{1,2,\cdots,L\}\tag{13.3}$$

式中，ϕ_i^N 是通过反应 i 的分数通量；反应 i 被认为属于反应组 N 内（见 13.3 节实例研究）。另外，在 12.3 节的实例研究中，几个组通量是以实际网络通量之和或之差的形式被定义的，如式(12.10)～式(12.14)所示。在这种情况中，对于一个反应或反应组对所组合的组通量的影响，组通量系数被表示为 gFCCs 对各单个通量的加权平均。因此，如果组 Z 的通量是通量 J_1 和 J_2 的和，则描述组 N 的变化对组 Z 通量的影响的 gFCC 可由下式给出：

$$^{*}C_N^{J_Z}=\frac{^{*}C_N^{J_1}J_1+{}^{*}C_N^{J_2}J_2}{J_1+J_2}\tag{13.4}$$

更一般地，如果进或出任一反应组 Z 的通量以网络通量的形式来定义：

$$J_Z=\sum_{k=1}^{L}\sigma_k^Z J_k\tag{13.5}$$

因此，对于任何组 N 对通过组 Z 的通量的影响，所产生的组通量控制系数由下式给出：

$$^{*}C_N^{J_Z}=\frac{\sum_{k=1}^{L}\sigma_k^Z\ {}^{*}C_N^{J_k}J_k}{J_Z}\tag{13.6}$$

式中，$^{*}C_N^{J_k}$ 由式（13.3）定义。

对代谢物库的 gCCC 可以写出一组类似的方程，代谢物库是两个（或多个）实际代谢物浓度的总计，就像在实例研究中用 X5P 和分支酸的情况一样，例如，对总的代谢物库等于 c_1+c_2 的情况（即代谢物 X_1 和 X_2 浓度的和），其组浓度控制系数可定义为：

$$^{*}C_N^{X_1+X_2}=\frac{^{*}C_N^{X_1}c_1+{}^{*}C_N^{X_2}c_2}{c_1+c_2}\tag{13.7}$$

因为组通量控制系数是作为网络通量控制的重要度量标准而出现的，有必要规定其确定方法。显然，gFCC 一定来自网络通量和由对网络的实验扰动所导致的网络通量变化。在下一节，将会看到围绕连接代谢物的通量变化测量是如何确定组控制系数的。

13.2 由通量测量确定组控制系数（自上而下法）

在第 11 章，描述了单个通量控制系数确定的不同方法，这些方法常常需要接着对研究中的酶活性或反应速率的已知变化进行通量变化的测量。另一方面，组通量控制系数一般不能用类似的方法来确定，原因很简单，因为除非组内每一反应的活性发生等同的变化，通常不可能控制整个反应组的活性变化。因此，有必要开发一种根据反应组内的策略扰动来确定组控制系数的方法。这一节仿效 Stephanopoulos 和 Simpson（1997 年）的工作介绍了这种方法。这种方法是基于 Small 和 Kacser（1933a，b）所发展的大扰动理论（11.5 节）。对分支途径及复杂网络，已经扩展了 Small 和 Kacser 的理论，以确定来源于反应组内单个步骤的扰动的组控制系数。在这种分析中，每一反应的可逆一级动力学的假定，自然地扩展到每个组的总体动力学，如 11.5 节所示的那样。以下将提供确定在平衡的分支反应网络中组或单个控制系数的程序。应该注意到，在一个未分支途径中，11.5.1 节中所证明演示的程序是全面的。

在分支网络中，组浓度控制系数的确定需要连接代谢物浓度的测量，还需要测定由连接代谢物进入每个反应组的通量。这种测量必须在检查中（即基态）的稳态条件下完成，同时还在对基态不同诱导的扰动之后得到的稳态条件下来完成。此外，每一个这样的扰动一定来源于单个反应组内的一个或多个反应。这些扰动的例子包括由酶的调控变化而引起的活性改变、该组内表达酶的基因的拷贝数的增加或者通过其外部底物浓度的变化所致的运输步骤的增强。不能被局限在单个反应组内的系统扰动（例如温度和 pH 的变化），一般不服从下面叙述的分析结果。

作为一个经验规则，三个扰动的最小值，其中每一个均来自不同的组，被用来确定分支网络中的所有组控制系数。然而，一个设计良好的扰动可以产生足够的信息，以至于只需要一个另外的扰动而不是两个即可。下面介绍这两种情况。

13.2.1 从三个扰动确定 gFCCs

这里描述，从基态时的通量和对三个分支的每一个扰动所产生的通量，来确定围绕一个分叉分支点的组控制系数。原则上，在基态下及三种扰动状态下三个组通量的测量对全部 gFCCs 的确定是必要的和足够的。另外，如果每一个扰动对代谢物浓度的影响被测量，组浓度控制系数也就可以确定。

该方法是对图 12.8 中描绘的简单分支点而介绍的。该图适用于所有复杂的代谢网络。因而，围绕适当定义的分支点的每一种稳定状态可以通过连接代谢物 X_j 的水平及三个组通量 J_A、J_B 及 J_C 来表征。其中每一个通量代表从连接代谢物进入相应组的通量，反之亦然（见 12.3 节）。因为这种分析涉及到四种单独的状态（基态以及三种扰动之后所达到的状态）的通量，每一种状态将以一个下标来表示，结果是 $J_{k,0}$ 指的是基态下通过组 k 的通量。$J_{k,A}$，$J_{k,B}$，$J_{k,C}$ 分别指源于组 A、B 和 C 的扰动所产生的通过组 k 的新稳态通量。

回忆一下 11.5 节的情况，每一种扰动状态均可被单个扰动常数 K_i 来表征，这样以至于：

$$K_i = \frac{{}^*C_i^{J_A}}{f_i^A - 1} = \frac{{}^*C_i^{J_B}}{f_i^B - 1} = \frac{{}^*C_i^{J_C}}{f_i^C - 1} \quad i \in \{A, B, C\} \tag{13.8}$$

式中，f_i^k 为通量扩增因子，其定义为每个扰动后的通量与其基态下扰动通量的比值：

$$f_i^k = \frac{J_{k,i}}{J_{k,0}} \qquad i, k \in \{A, B, C\} \tag{13.9}$$

式（13.8）把 gFCCs 与放大因子及扰动常数给予关联。此方程的形式显示：一个特定扰动导致的每一个组通量的分数变化正比于来自扰动源与组有关的组分的 gFCC 值。该比例常数在所有三个分支上是相等的，并且由扰动常数 K_i 来定义。此常数值反比于相应扰动值的大小。此外，因为通量扩增因子对每一个扰动而被测量，如果每一个扰动的扰动常数已知的话，gFCC 就可从式（13.8）计算出来。扰动常数的确定将在下面描述。

对此分支点引入加和定理以补充式（13.8），并对三个分支的每一种情况可表示如下：

$$ {}^*C_A^{J_k} + {}^*C_B^{J_k} + {}^*C_C^{J_k} = 1 \qquad k \in \{A, B, C\} \tag{13.10}$$

以通量扩增因子和扰动常数的形式，应用式（13.8）来表达式（13.10）中的组控制系数，由加和定理得出：

$$K_A(f_A^k - 1) + K_B(f_B^k - 1) + K_C(f_C^k - 1) = 1 \qquad k \in \{A,B,C\} \tag{13.11}$$

这种表达可按以下定义进一步简化：

$$p_i^k = f_i^k - 1 = \frac{J_{k,i} - J_{k,0}}{J_{k,0}} \qquad i, k \in \{A,B,C\} \tag{13.12}$$

其产生以下三种加和方程的形式

$$\begin{aligned} K_A p_A^A + K_B p_B^A + K_C p_C^A &= 1 \\ K_A p_A^B + K_B p_B^B + K_C p_C^B &= 1 \\ K_A p_A^C + K_B p_B^C + K_C p_C^C &= 1 \end{aligned} \tag{13.13}$$

或者以矩阵的形式

$$\begin{bmatrix} p_A^A & p_B^A & p_C^A \\ p_A^B & p_B^B & p_C^B \\ p_A^C & p_B^C & p_C^C \end{bmatrix} \begin{bmatrix} K_A \\ K_B \\ K_C \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} 1 \\ 1 \\ 1 \end{bmatrix} \tag{13.14}$$

尽管看起来这三种扰动常数能由上述方程的矩阵求逆所确定，但实际上并非如此，这是因为按照该分支点物质平衡的特性，式（13.14）中的方阵实际上是奇异的。本质上，在分支点 A 的通量变化不是独立的，因为其通量一定总是等于其它两个分支通量的和。因此，式（13.14）仅提供了计算扰动常数所必需的方程中的两个，第三个方程由分支原理提供，即：

$$\frac{{}^*C_C^{J_A}}{{}^*C_B^{J_A}} = \frac{J_{C,0}}{J_{B,0}} \tag{13.15}$$

也可由成比例的通量变化和扰动常数的形式来表示：

$$\frac{K_C}{K_B} = \frac{J_{C,0}\, p_B^A}{J_{B,0}\, p_C^A} = q \tag{13.16}$$

当此式与式（13.14）连同使用，对前两个扰动常数，得到如下解：

$$\begin{bmatrix} K_A \\ K_B \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} p_A^B & p_B^B + p_C^B q \\ p_A^C & p_B^C + p_C^C q \end{bmatrix}^{-1} \begin{bmatrix} 1 \\ 1 \end{bmatrix} \tag{13.17}$$

一旦第三个扰动常数由式（13.16）确定，所有 9 个组控制系数可从下式计算：

$$^*C_i^{J_k} = K_i(f_i^k - 1) \qquad i, k \in \{A, B, C\} \tag{13.18}$$

【例 13.1】 赖氨酸生物合成途径 gFCCs 的确定

前面的方法已被应用到天冬氨酸生物合成途径的组通量控制系数的确定（simpson et al，1998)。表 10.1 和图 10.2 所概括的这条途径是第 10 章通量确定实例研究的主题。在那章已确定出赖氨酸生产的关键分支点是丙酮酸。实际上，由于不能对由丙酮酸羧化酶和 PEP 羧化酶所催化的回补途径进行区分，在定义复合 Pyr/PEP 分支点时，两种代谢物 Pyr 和 PEP 被归并到一起。通过应用上述方法于各种扰动实验所获得的数据（包括 6-磷酸葡萄糖脱氢酶被减弱的变异体、葡萄糖及葡萄糖酸发酵，添加氟丙酮酸以专门抑制丙酮酸脱氢酶复合物的活性、添加苏氨酸以抑制天冬氨酸激酶的活性以及添加丙酮酸激酶缺失变异体)，以下三个反应组的组通量控制系数能被确定：分支点上游的糖酵解反应（组 A)，呼吸循环（组 B）以及天冬氨酸生物合成途径（组 C)。结果以 gFCCs（$^*C_i^{J_k}$）的形式归纳在下表中。

被扰动的组（i）		受影响的通量（J_k）		
组	扰动形式	J_A	J_B	J_C
A	减少葡萄糖添加量 减弱 6-磷酸葡萄糖变异体 添加葡萄糖酸	0.08	0.50	0.42
B	复合培养基（工业发酵） 氟丙酮酸抑制丙酮酸激酶	0.16	1.24	-0.40
C	天冬氨酸激酶的苏氨酸抑制	0.02	-0.22	1.20

借助于组通量控制系数的特性，这个表概括了上述反应组中每个组对通过每个其它组的通量所施加的控制。可以看到，对天冬氨酸的大部分通量控制是来自同一条途径的反应，其它两组的影响是相当有限的。根据对赖氨酸形成的可能限制反应的推测，其中包括由 NADPH 可得性、ATP 或丙酮酸等方面的限制，这个结果是有意义的。

我们也应注意到该表是许多（多于三个）不同扰动实验的一致结果，其基本上都收敛到相同的最终结果。由完全不同的和冗余的扰动实验所获得的 gFCC 估计值之间的良好一致性增强了获得 gFCC 值的信心，同时也支持上述方法的有效性。

13.2.2 从已表征的扰动确定 gFCCs

如果起始反应组总活性的分数变化是已知的，在这种情况下，通过应用由大偏差理论所推出的关系（11.5 节)，gFCCs 可直接从它们的定义来确定。在这种情况下一个扰动被认为是已表征的扰动。一般来讲，这种扰动很难实施，因为一个反应组的总活性依赖于该组中所有反应的动力学。结果，特征化的扰动通常仅仅是在下述情况下才有可能，其包含一个单个反应、一个接近完全关闭的反应组或整个组的同时扩增。

引入活性扩增因子 r_i 以表征组 i 内的扰动：

$$r_i = \frac{^*v_{i,i}}{^*v_{i,0}} \qquad i \in \{A, B, C\} \tag{13.19}$$

在此方程中，$^*v_{i,0}$ 及 $^*v_{i,i}$ 分别代表组 i 特征化扰动前后的总活性。在由大偏差方程所假定的可逆的和一级反应动力学的情况下，在一个分支或未分支网络中每一个的总活性也是可逆的和一级的（见 11.5 节)。这些方程给出了扩增因子和扰动常数之间的如下关系：

$$K_i=\frac{r_i}{f_i^i(r_i-1)} \qquad i\in \{A, B, C\} \tag{13.20}$$

例如，如果将一特征化的扰动（即具有已知的 r_i）引入图 12.8 的组 B，在基态和扰动状态下通量的测量允许从式（13.20）直接确定 K_B。如果 K_B 值被这样确定，K_C 就可利用式（13.16）从组 C 的未特征化的扰动中计算出来，从这两个扰动常数，九个 gFCCs 值中的六个就可通过式（13.18）予以确定。其余的三个可通过加和定理来确定，即式（13.10）。

根据这些表达式单个 FCC 的类似，在一个单一反应中一个特征化了的扰动也允许来确定那个反应的单个通量控制系数。因此，对于反应 i 中的一个特征化了的扰动，通过每一反应 k 的通量变化的测量，就可求出一个单个系数（Small and Kacser，1993 b）

$$C_i^{J_k}=\frac{r_i(f_i^k-1)}{f_i^i(r_i-1)} \qquad i,k\in\{1,2,\cdots,L\} \tag{13.21}$$

在此方程中，r_i 是单个步骤的活性扩增因子。

13.2.3 gCCCs 的确定

一旦组通量控制系数已知，连接代谢物的组浓度控制系数便可确定。对此计算所需要的惟一附加的测量是连接代谢物 X_j 在基态下（$c_{j,0}$）和每一扰动态下（$c_{j,i}$）的浓度。根据这些测量值，通过下面的关系（Small and Kacser，1993 b)，就可得出 gCCC 的值：

$$^*C_i^{X_j}=K_i\left(\frac{c_{j,i}}{c_{j,0}}-1\right) \qquad i\in\{A,B,C\},j\in\{1,2,\cdots,K\} \tag{13.22}$$

对未被扰动的任何分支的 gCCC 值可从加和定理中得出：

$$C_A^{X_j}+C_B^{X_j}+C_C^{X_j}=0 \qquad j\in\{1,2,\cdots,K\} \tag{13.23}$$

虽然，仅对连接代谢物而言，这完全正确，但是通过代替适当的浓度值，这些方程也提供了其它代谢物的组浓度控制系数的估计值。这些 gCCC 估计值的重要性，在 13.5 节通量扩增的讨论中会很清楚。

13.2.4 扰动的可观察性

即使对任何大动力学扰动的一般情况推出了上述的方程，每一种扰动的实际可允许的大小在功能上是受约束的。在酶活性无限小变化的极端情况下，这些式子的每一个最终都还原为系数的定义。然而，正如第 11 章所指出的那样，非常小幅度的扰动会遭受大的测量误差，因而不是特别有用。从另一极端情况来讲，非常大的扰动可能扰乱网络的稳定性，导致不可预料的代谢变化或甚至不能使系统达到稳定状态（见 13.5 节）。这两种极端情况最好通过使用已知能产生稳定的可测量的影响的扰动使其予以避免，或者使用一系列可接受的扰动来加以避免。

最后一点是关于所需要的扰动的数量。尽管从原则上来讲，组通量控制系数可仅从两个或三个扰动中被确定，但为了检验结果的一致性，利用多于所需要的最少测量是明智的（见 13.6 节）。这一点在例 12.2 中得到了证明。然而，多分支点的分析不能被围绕每一分支点的三个或更多个扰动的需要所阻碍。事实上，如果它们被充分定位（即，在围绕每个分支点的单一分支)，在一个分支点的分析中所使用的扰动也能用于任何数目的其它分支点，只要适当的通量能被测量即可。因此，六个战略上设置的扰动可以容许围绕四个不同连接代谢物的 gFCCs 的确定而且也对每一个提供一个一致性检验。此概念的衍生结果在 13.4 节中更充分地探讨，在 13.4 节中将表明邻近分支点的分析允许关键步骤搜寻的定位，同时也允许某些单个控制系数的确定。

13.3 实例研究

在这一节中，以 *S.cerevisiae* 为实例研究对象，举例说明自下而上法及自上而下法在分支点通量控制阐述中的应用。

13.3.1 组控制系数的解析确定（自下而上法）

通过对模拟网络应用表 12.2 的动力学表达式，所有单个 FCC 及 CCC 可以解析确定。计算是通过稳态代谢物浓度和通量平衡的解来进行，接下来使用 11 章的方法确定控制系数。结果列在表 13.1 和表 13.2 中，在这两张表中的数值检验显示反应 4 对大部分网络通量具有很大的控制程度。这是由磷酸果糖激酶（PFK）所催化的步骤，其展示出很强的 ATP 依赖型动力学（见表 12.2）。下面将表明与 PFK 步骤相关的大控制系数是如何反映在适当的组控制系数的大小中的，以及如何能从适当的组控制系数的大小中推论出来。

表 13.1 氨基酸生物合成网络的通量控制系数①

k	被扰动的反应 i②								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
1	0.07	0	0	0.94	0.03	-0.07	-0.03	-0.01	0.01
2	0.07	0	0	0.94	0.03	-0.07	-0.03	-0.01	0.01
3	1.64	0	0.99	-1.64	-0.05	0.13	0.04	0.01	-0.02
4	0.06	0	0	0.95	0	-0.04	0.01	0	0.01
5	0.06	0	0	0.95	0.06	-0.04	-0.06	0	0.01
6	0.07	0	0	0.92	0.01	0.04	-0.02	0.04	-0.01
7	0.06	0	0	0.95	-0.94	-0.04	0.94	0	0.01
8	-0.04	0	-0.01	-0.25	0.07	1.16	-0.1	0.9	-0.2
9	0.05	0	0	0.95	0.12	-0.17	-0.11	-0.04	0.03
10	0.05	0	0	0.95	0.12	-0.17	-0.11	-0.04	0.03
11	0.05	0	0	0.84	0.1	-0.23	-0.09	-0.03	0.04
12	0.03	0	0	0.59	0.07	-0.16	-0.06	-0.02	0.03
13	0.06	0	0	1.08	0.13	-0.3	-0.12	-0.04	0.05
14	0.08	0	-0.02	1.7	0.26	0.26	-0.27	-0.13	-0.05
15	0.05	0	0	0.84	0.1	-0.23	-0.09	-0.03	0.04
16	0.03	0	0	0.59	0.07	-0.16	-0.06	-0.02	0.03
17	0.06	0	0	1.08	0.13	-0.3	-0.12	-0.04	0.05
18	0.08	0	-0.02	1.7	0.26	0.26	-0.27	-0.13	-0.05

k	被扰动的反应 i②								
	10	11	12	13	14	15	16	17	18
1	0.04	0.01	0	0	-0.01	0.01	0.01	0.01	-0.01
2	0.04	0.01	0	0	-0.01	0.01	0.01	0.01	-0.01
3	-0.06	-0.01	0	0	0.01	-0.02	-0.02	-0.01	0.01
4	0.02	0	0	0	0	0	0	0	0
5	0.02	0	0	0	0	0	0	0	0
6	-0.02	-0.02	0	0	0.02	-0.02	-0.02	-0.02	0.01
7	0.02	0	0	0	0	0	0	0	0
8	-0.57	0.07	0.04	-0.04	-0.07	0.1	-0.04	0.04	-0.06
9	0.08	0.04	-0.01	0.01	-0.04	0.05	0.05	0.04	-0.03
10	0.08	0.04	-0.01	0.01	-0.04	0.05	0.05	0.04	-0.03
11	0.11	0.09	-0.01	0.01	-0.09	0.11	0.09	0.08	-0.07
12	0.08	0.06	0.35	-0.35	-0.06	0.08	0.37	0.06	-0.05
13	0.15	0.11	-0.35	0.35	-0.11	0.14	-0.17	0.1	-0.09
14	-0.13	-0.31	0.01	-0.01	0.31	-0.41	-0.28	-0.28	0.26
15	0.11	0.09	-0.01	0.01	-0.09	0.11	0.09	0.08	-0.07
16	0.08	0.06	0.35	-0.35	-0.06	0.08	0.37	0.06	-0.05
17	0.15	0.11	-0.35	0.35	-0.11	0.14	-0.17	0.1	-0.09
18	-0.13	-0.31	0.01	-0.01	0.31	-0.41	-0.28	-0.28	0.26

① 用结构方法（Reder，1998）解析确定相应于网络基态的通量控制系数。每一个系数 $C_i^{J_k}$ 描述了反应 i 的扰动对通过反应 k 的通量的影响。

② 反应号与图 12.1 的序列号一致。

表 13.2 氨基酸生物合成网络的浓度控制系数①

X_j	被扰动的反应 i②								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Glc	0.24	-3.24	0.02	3.23	0.03	-1.13	0	0.05	0.2
G6P	0.18	0	0	-0.18	-0.01	0.01	0	0	0
FDP	0.19	0	0.01	2.56	-2.33	-1.52	-0.01	0.13	0.26
PEP	0.15	0	0	2.28	0.17	-1.69	-0.13	0.02	-0.19
ATP	-0.04	0	-0.01	-0.25	0.07	1.16	-0.1	-0.1	-0.2
DAHP	0.07	0	0.01	0.74	-0.02	-1.36	0.05	0.09	0.77
CHR	0.64	0	-0.05	11.3	1.32	-3.14	-1.23	-0.4	0.54
PPH	0.1	0	-0.01	1.68	0.2	-0.47	-0.18	-0.06	0.08
X5P	0.1	0	-0.02	2.18	0.34	0.35	-0.35	-0.17	-0.06
Phe	0.03	0	0	0.59	0.07	-0.16	-0.06	-0.02	0.03
Tyr	0.06	0	0	1.08	0.13	-0.3	-0.12	-0.04	0.05
Trp	0.08	0	-0.02	1.7	0.26	0.26	-0.27	-0.13	-0.05
ADP	0.01	0	0	0.08	-0.02	-0.36	0.03	0.03	0.06
X_j	被扰动的反应 i②								
	10	11	12	13	14	15	16	17	18
Glc	0.55	-0.03	-0.04	0.04	0.03	-0.04	0.08	0	0.03
G6P	-0.01	0	0	0	0	0	0	0	0
FDP	0.74	-0.1	-0.05	0.05	0.1	-0.13	0.06	-0.05	0.08
PEP	-0.53	0.01	0.04	-0.04	-0.01	0.02	-0.09	-0.01	-0.01
ATP	-0.57	0.07	0.04	-0.04	-0.07	0.1	-0.04	0.04	-0.06
DAHP	-0.7	-0.08	-0.16	0.16	0.08	-0.1	0.34	0.04	0.07
CHR	1.53	-3.79	-0.09	0.09	-1.15	1.51	-2.9	-3.25	-0.94
PPH	0.23	0.17	-0.54	-1.01	-0.17	0.22	-0.26	0.16	-0.14
X5P	-0.17	0.31	0.01	-0.01	-0.31	-2.44	0.23	0.26	-0.25
Phe	0.08	0.06	0.35	-0.35	-0.06	0.08	-0.63	0.06	-0.05
Tyr	0.15	0.11	-0.35	0.35	-0.11	0.14	-0.17	-0.9	-0.09
Trp	-0.13	-0.31	0.01	-0.01	0.31	-0.41	-0.28	-0.28	-0.74
ADP	0.17	-0.02	-0.01	0.01	0.02	-0.03	0.01	-0.01	0.02

① 用结构方法（Reder，1998）解析确定相应于网络基态的浓度控制系数。每一个系数 $C_i^{X_j}$ 描述了反应 i 的扰动对代谢物 X_j 浓度的影响。

② 反应号与图 12.1 中的序号一致。

注：CHR—分支酸；PPH—预苯酸；X5P—5-磷酸核酮糖；Phe—苯丙氨酸；Tyr—酪氨酸；Try—色氨酸。

分支点 1——ATP

ATP 是此网络中最主要的连接代谢物，正如 12.3 节所证明的那样（鼓励读者在下面的讨论中参考该节）。围绕此分支点的组控制系数的确定必须用一个清晰的通量定义开始，而这些通量在每一个反应组内均应予以计算。对与其它分支中的任何一个都没有共同反应的分支 B 的通量等于反应 8 的通量。另一方面，分支 A 中的反应与分支 C 中的反应发生重叠，因为通过糖酵解途径与能量相关的通量仅仅是通过反应 1、2、4 与 5 的通量的一部分。因此，有必要确定应当考虑属于分支 A 的这些步骤中每一步的确切分数。正如在式（12.10）中所确定的，通过分支 A 的真正通量是由通过反应 6 的通量所定义的，因为这个反应完全归属于分支 A 中。因此，ϕ_1^A（归属于分支 A 中的反应 1 的通量的分数）等于 $\frac{1}{2}J_6/J_1$，而 ϕ_5^A 等于 J_6/J_5，ϕ_6^A 等于 J_6/J_6 或 1。这些分数也可通过图 12.9 所示的组 A 的核心矩阵予以

严格确定。例如，对反应 1 应用式（12.8），组 A 内反应 1 的总通量为：

$$J_1^A = 3J_{18} + J_{16} + J_{17} + J_3 + \frac{1}{2}J_7 + \frac{1}{2}J_8 = \frac{1}{2}J_6 \tag{13.24}$$

[这个结果可通过将组核心矩阵 A（图 12.9）中反应 1 的表列输入值除以比例因子和乘以特征通量而获得] 显然，ϕ_1^A 是这个结果对 J_1 的比，J_1 为通过反应 1 的总通量。通过反应 1、2、4 及反应 5 的其余通量被置于分支 C 中，在分支 C 中也包括反应 3、7 及反应 9～反应 18（见图 12.9 中所示的组核心矩阵）。属于每一个组的通量可同样地确定。

一旦与每组相关的通量系数已经弄清，gFCC 就可由表 13.1 的单个通量控制系数用 13.1 节的方程计算出来。为简单起见，用对应于与分支 B 的一个扰动的 gFCC 开始，因为分支 B 仅包含反应 8。由于通过分支 A 的通量为 J_6，${}^*C_B^{J_A} = C_8^{J_6} = 0.04$。类似地，${}^*C_B^{J_B} = C_8^{J_8} = 0.9$。因为分支 C 的通量是在两个单个反应通量的差，${}^*C_B^{J_C}$ 应当通过利用表 12.4 中的通量数据并应用式（13.6）求出。因此，

$${}^*C_B^{J_C} = \frac{J_6 C_8^{J_6} - J_8 C_8^{J_8}}{J_6 - J_8} = -0.05 \tag{13.25}$$

事实上，这是式（13.6）的一个一般结果。对应于一个特定扰动了的分支的第三个 gFCC 可由前两个来确定：

$${}^*C_i^{J_C} = \frac{J_A {}^*C_i^{J_A} - J_B {}^*C_i^{J_B}}{J_A - J_B} \qquad i \in \{A, B, C\} \tag{13.26}$$

对于在分支 A 中的一个扰动对其自身的影响，有必要应用式（13.3）：

$${}^*C_A^{J_A} = \left(\frac{1}{2}J_6/J_1\right)C_1^{J_6} + \left(\frac{1}{2}J_6/J_2\right)C_2^{J_6} + \left(\frac{1}{2}J_6/J_4\right)C_4^{J_6} + (J_6/J_5)C_5^{J_6} + C_6^{J_6} = 0.59 \tag{13.27}$$

类似地，${}^*C_A^{J_B}$ 可通过用 $C_i^{J_8}$ 取代式（13.27）中的每个 $C_i^{J_6}$ 确定而得到为 1.05。通过用式（13.26），从这两个结果得出 ${}^*C_A^{J_C}$ 为 0.54。其余的三个 gFCCs 可从加和定理求得。这些结果总结在表 13.3 中。

表 13.3 ATP 分支点的组控制系数①

被扰动的分支 N		通量 ${}^*J_k$ 的 gFCC			gCCC
组	组成步骤②	J_A	J_B	J_C	${}^*C_N^{ATP}$
A	$1_{0.41}$ $2_{0.41}$ $4_{0.56}$ $5_{0.6}$ 6	0.59	1.05	0.54	1.05
B	8	0.04	0.90	−0.05	−0.10
C	$1_{0.59}$ $2_{0.59}$ 3 $4_{0.44}$ $5_{0.4}$ 7 9～18	0.37	−0.95	0.51	−0.95

① gFCCs 以 ${}^*C_N^{J_k}$ 的形式表示。gCCCs 以 ${}^*C_N^{ATP}$ 的形式表示。

② 反应号与图 12.1 中的序号一致。下标值代表 ϕ_i^N，即包含在分支 N 中的上述反应通量的分数。

所得的 gFCC 表明，分支 A 对所有三个分支都施加着显著的控制。另一方面，分支 B 仅影响其本身。最后，分支 C 对其本身及分支 A 施加着显著的正控制，但对分支 B 施加很强的负控制。然而，与其它两个相比，只给了分支 B 一个相当小的通量，这可断定为一个非关键分支点，因为从分支 A 流进分支 C 显然居统治地位，且实际上不受分支 B 的影响。然而，在分支 A 和 C 之间控制的分布和组浓度控制系数的相对重要程度可能使得这个分支点值得更密切的检验。

分支点 2——6-磷酸葡萄糖（G6P）

在 G6P 分支点，多聚糖形成的途径从糖酵解途径分出叉来。因为与能量相关的酵解通

量已经被划分到上游反应（在 ATP 分支点），仅仅与碳相关的通量流入 G6P 分支点，正如式（12.11）所得出的。从图 12.10 回想到，与全部能量有关的糖酵解途径部分（ATP 分支点的组 A 或组 A_{ATP}）被认为是在 G6P 分支点的组 A 中，但从分支 A_{G6P}进入 G6P 分支点的通量是仅与碳有关的通量。分支 B_{G6P}全部由反应 3 组成，分支 C 由 G6P 下游的其余步骤组成，正如图 12.10 的组核心矩阵所示。

让我们转到从表 13.11 中的 FCCs 值来确定这个分支点的 gFCCs。因为分支 B 最简单，仅由反应 3 组成，首先来确定它相应的 gFCC 值。当然，${}^*C_B^{J_B}$ 等于 $C_3^{J_3}$ 或 0.99，因为 $C_3^{J_2}$ 及 $C_3^{J_6}$ 均为零，由此推出 ${}^*C_B^{J_A}$ 为零。由这些通过式（13.25）得出 ${}^*C_B^{J_C}$ 非常接近于零，分支 A 中一个扰动的影响必须根据 13.1 节中的方程来确定。因此，

$$ {}^*C_A^{J_B} = {}^*C_A^{J_3} = C_1^{J_3} + C_2^{J_3} + \left(\frac{1}{2}J_6/J_4\right)C_4^{J_3} + (J_6/J_5)C_5^{J_3} + C_6^{J_3} + C_8^{J_3} = 0.83 \qquad (13.28) $$

因为 J_A 和 J_C 均是从许多反应的通量的形式按式（12.11）来定义的，必须用式（13.6）确定出其中一个。考虑来自分支 A 的通量，它等于 $J_2 - \frac{1}{2}J_6$。首先 ${}^*C_A^{J_2}$（0.53）和 ${}^*C_A^{J_6}$（0.67）都必须以如式（13.28）同样的方式，通过用 2 和 6 分别取代该式上标中的 3 而计算。一旦这些值求出，对分支 A 通量应用式（13.6），得出：

$$ {}^*C_A^{J_A} = \frac{J_2\,{}^*C_A^{J_2} - \frac{1}{2}J_6\,{}^*C_A^{J_6}}{J_2 - \frac{1}{2}J_6} = 0.43 \qquad (13.29) $$

其余的 gFFCs 可通过加和定理和式（13.26）来确定。结果列在表 13.4 中。这个分支点可有效地处理为一条未分支途径，因为分支 B 的通量是不显著的而且分支 B 对其它两个分支几乎没有什么影响。由非常小的组浓度控制系数的补充揭示，很清楚，这不是一个关键分支点。

表 13.4　6-磷酸葡萄糖分支点的组控制系数①

被扰动的分支 N		通量 ${}^*J_k$ 的 gFCC			gCCC
组	组成步骤②	J_A	J_B	J_C	${}^*C_N^{G6P}$
A	1　2　$4_{0.56}$　$5_{0.6}$　6　8	0.43	0.83	0.43	0.08
B	3	0	0.99	0	0
C	$4_{0.44}$　$5_{0.4}$　7　9～18	0.57	−0.82	0.57	−0.08

① gFCCs 以 ${}^*C_N^{J_k}$ 的形式表示。gCCCs 以 ${}^*C_N^{G6P}$ 的形式表示。

② 反应号与图 12.1 中的序号一致。下标值代表 ϕ_i^N，即包含在分支 N 中的上述反应通量的分数。

分支点 3——1,6-二磷酸果糖(FDP)/3-磷酸甘油醛(GAP)

在 FDP/GAP 分支点，产生甘油途径从氨基酸生物合成途径发生分叉。因此，一个下游组（B）仅由反应 7 组成。上游组（A）由反应 1～4 和反应 8 以及通过反应 5 和反应 6 的与能量相关的途径组成，其位于第一个分支点的上游。分支 C 包括反应 5 的通量的其余部分及反应 9～18 的通量。因为计算这个分支点的组通量控制系数的程序基本上等同于前面分支点计算的程序，我们将直接得出结果（表 13.5）。进而，因为通过分支 B 的通量相对较小，且分支 B 对其它两个分支几乎没施加什么控制，因此这个分支点可被确定为非关键分支点。另外，对应于分支 A 的大 gFCCs 表明主要的起控制作用的反应位于这个分支点的上游。

表 13.5 FDP/GAP 分支点的组控制系数①

被扰动的分支 N		通量 $^*J_k$ 的 gFCC			gCCC
组	组成步骤②	J_A	J_B	J_C	$^*C_N^{FDP}$
A	1~4 $5_{0.6}$ 6 8	0.83	0.41	0.90	-0.02
B	7	0	0.94	-0.16	-0.01
C	$5_{0.4}$ 9~18	0.17	-0.35	0.26	0.03

① gFCCs 以 $^*C_N^{J_k}$ 的形式表示。gCCCs 以 $^*C_N^{FDP}$ 的形式表示。

② 反应号与图 12.1 中的序号一致。下标值代表 ϕ_i^N，即包含在分支 N 中上述反应通量的分数。

分支点 4——5-磷酸核酮糖（X5P）+ 分支酸（CHR）

通过这个网络的第四个分支点的通量比前面的三个简单许多。因为耦合的与能量有关的途径全部位于该节点的上游。只有一步（即反应 5）被分进围绕此分支点的不同的组内。这是因为要求通过反应 5 的少量通量通过反应 18 以对抗磷酸烯醇丙酮酸进入 3-磷酸甘油醛的循环。这个通量受反应 18 控制，因此，分支 B 内由计算所得反应 5 的数量（ϕ_5^B）等于 J_{18}/J_5。因为围绕这些分支点的组通量的每一个等价于单个反应的通量，gFCCs 的计算很直接的。其结果列于表 13.6 中。然而，连接代谢物的组浓度控制系数的确定并非如此简单，因为该分支点是按 X5P 和 CHR 产生和消耗的固定比率被标记的。

表 13.6 X5P + CHR 分支点的组控制系数①

被扰动的分支 N		通量 $^*J_k$ 的 gFCC			gCCC
组	组成步骤②	J_A	J_B	J_C	$^*C_N^{X/C}$
A	1~4 $5_{0.98}$ 6~10	0.89	1.30	0.79	9.18
B	$5_{0.02}$ 14 18	-0.07	0.58	-0.16	-1.82
C	11~13 15~17	0.18	-1.28	0.37	-7.36

① gFCCs 以 $^*C_N^{J_k}$ 的形式表示。gCCCs 以 $^*C_N^{X/C}$ 的形式表示。

② 反应号与图 12.1 中的序号一致。下标值代表 ϕ_i^N，即包含在分支 N 中的上述反应通量的分数。

首先，从分支 B 开始，X5P 和 CHR 的 gFCC 值可通过式（13.3）的 CCC 类似形式来确定：

$$^*C_B^{X5P} = (J_{18}/J_5)C_5^{X5P} + C_{14}^{X5P} + C_{18}^{X5P} = -0.55 \tag{13.30}$$

$$^*C_B^{CHR} = (J_{18}/J_5)C_5^{CHR} + C_{14}^{CHR} + C_{18}^{CHR} = -2.06 \tag{13.31}$$

之后，利用式（13.7）得：

$$^*C_B^{X/C} = \frac{^*C_B^{X5P} c_{X5P} + {}^*C_B^{CHR} c_{CHR}}{c_{X5P} + c_{CHR}} = -1.82 \tag{13.32}$$

对其它两个分支，类似的计算也可进行。所得的结果 gCCCs（见表 13.6）非常大，表明可能是一个关键分支点。事实上，大的浓度控制系数暗示这会太容易以致不能提高或降低这些代谢物到不稳定的水平。另外，组通量控制系数被跨越分布于所有三个分支中，超过以前的任何一个分支点。总之这个分支点看起来像是一个关键点。

分之点 5——预苯酸（PPH）

此网络中的最后一个分支点不同于色氨酸和酪氨酸途径。这是要分析的最简单的分支点，因为所有的组通量是实际的反应通量而且在一个单一分支内每一步都完全适合，结果见表 13.7。

表 13.7 PPH 分支点的组控制系数①

被扰动的分支 N		通量 $^*J_k$ 的 gFCC			gCCC
组	组成步骤②	J_A	J_B	J_C	$^*C_N^{PPH}$
A	1~11 14 18	0.83	0.57	0.07	1.75
B	12 16	0.08	0.72	-0.52	-0.80
C	13 17	0.09	-0.29	0.45	-0.85

① gFCCs 以 $^*C_N^{J_k}$ 的形式表示。gCCCs 以 $^*C_N^{PPH}$ 的形式表示。

② 反应号与图 12.1 中的序号一致。

注意到，在这种情况下，下游分支中没有一个对上游分支施加显著的影响。然而，两个下游分支强烈地控制它们自己并互相控制。这显然是柔性分支点的标志，因为分支点代谢物能被显著地转向任一产品。这些数据同 gFCCs 的有意义的值相结合以表明这个分支点可能也是一个关键分支点。

这五个分支点的每一个组控制系数的大小，对它们在控制通过该网络的通量中可以起的潜在作用有重要的理解。在 13.4 节，将说明通过对邻近分支点 gFCCs 值的比较而能得到的附加结果。然而，需要记住的是：组控制系数不能通过自下而上法进行解析计算，就像我们这里所做的那样，这是因为缺乏单个通量控制系数的信息。在下一节中，将说明如何利用自上而下法通过通量测量从实验上得到组控制系数，以得出类似于在这里所得出的结论。

13.3.2 gFCCs 实验确定的模拟（自上而下法）

13.2 节概述了从战略扰动实验后所做的实验通量测量而计算 gFCCs 的方法。在本节中，用 *S. cerevisiae* 的动力学模型通过所模拟的扰动实验对这种方法进行证明示范。通过改变特定反应的动力学参数、运行所扰动的模拟实验、计算所产生的通量以及稳态浓度，每一个所模拟的扰动都被影响。通过这些条件与基态条件的比较（表 12.3 中所表示的），对每一次模拟扰动，通量扩增因子（FAF）都得以确定。这些 FAFs 的值随后被用于 13.2 节的方程中，以提供在每一分支点的组控制系数的估计值。

表 13.8 表明对每一分支点的组 FCCs 所得到的结果。就像前面讨论的那样，这些技术要求：只要独立的网络扰动之一是已表征的，这些扰动将被导入围绕一个连接代谢物的所识别的三个分支中的每一个中，或导入两个下游分支中。只要扰动是被定位于一个单个分支内，在每一个分支中被扰动的这个（些）步骤可以任意选择。例如，在 ATP 分支点，因为分支 B 仅由单一步骤（反应 8）构成，在这一分支中的扰动一定是对这一步而进行的，尽管分支 A 包含五个反应，其中仅有一个反应（反应 6）被完全包含在该分支中。因此，为确保分支 A 的扰动被完全定位于分支 A 内，反应 6 必须是受影响的惟一反应。由于分支 C 由反应 3、反应 7 和反应 9~18 组成，所以为在分支 C 内进行扰动，反应（步骤）的选择范围就更宽些。在实际实验中，这种决定会依据方便实验或适配性。因为在 13.4 节中将会很清楚的一些原因，在这里我们选择反应 14。另外，对 B 分支的已表征的扰动的应用使得在这种情况下 A 分支中的扰动没有必要了，所得的组控制系数见表 13.8 的第一小段。

虽然对这些模拟中所使用的网络动力学的扰动可以采用任何数学形式，但我们选择使用最简单最直观的形式——比例模型（proportional scaling）。因为比例变化在物理上有意义而且易于解释，所以这种模型很方便。因此，通过对反应 8 的动力学表达式乘以 0.5 在分支 B 引入已表征的扰动，通过加倍反应 14 的速率使分支 C 受到扰动。通过使用每一个扰动后的动力学表达式，就可以计算新的稳态。根据式（13.9），将这些新稳态下的通量与其基准态

表 13.8 每一分支点的组控制系数①

组		被扰动的分支 N			通量 $^{\bullet}J_k$ 的 gFCC			gCCC
		被扰动的步骤 i②	r_i	K_N	J_A	J_B	J_C	$^{\bullet}C_N^{ATP}$
N_{ATP}	A	—	—	—	1.18	2.27	1.07	2.3
	B	8③	0.5	-1.4	-0.02	0.39	-0.06	-0.61
	C	14	2	6.2	-0.16	-1.66	-0.01	-1.7
N_{G6P}	A	—	—	—	0.89	0.18	0.90	0.02
	B	3③	0.5	-2.0	0.00	1.00	-0.01	0.00
	C	14	2	-3.3	0.11	-0.18	0.11	-0.02
N_{FDP}	A	8	0.5	28.4	0.94	0.6	1.00	0.68
	B	7	0.5	-0.74	0.01	0.35	-0.05	-0.08
	C	14	2	-1.9	0.05	0.05	0.05	0.09
$N_{X/C}$	A	5	0.75	-19.0	0.83	1.93	0.68	5.2
	B	14	2	-0.5	0.02	-0.09	0.04	0.21
	C	17	0.75	-11.3	0.15	-0.85	0.28	-48
N_{PPH}	A	14	2	-14.4	1.02	0.72	1.31	1.9
	B	12	0.5	-1.3	-0.01	0.29	-0.3	-0.53
	C	17	0.75	0.27	-0.01	0	-0.01	-0.01

① gFCCs 是以 $^{\bullet}C_N^{J_k}$ 的形式表示。gCCCs 是以 $^{\bullet}C_N^{X}$ 的形式表示。活性扩增因子 r_i 和扰动常数 K_N 也在表中有所表示。

② 反应号与图 12.1 中的序号一致。

③ A 的特征性扰动也被用于这个分支。

的通量相比较以确定通量的扩增因子。由该分支点的这三个 FAFs 值用式(13.12)～式(13.20)来确定组通量控制系数。这些计算结果见表 13.8。此表也包括了每一组对连接代谢物 ATP 影响的组浓度控制系数。表 13.8 的其余四部分显示对于网络其它四个分支点的每一个的类似扰动的分析。

将表 13.8 中的结果与用自下而上法所计算的相应的 gFFCs 相比较（表 13.3～表 13.7 所示的结果被认为是我们所研究的网络的正确结果），几个观察结果依次如下。第一，虽然定量的一致不是特别好，但这些结果在定性上是可比的：它们识别出具有最大数值的gFFCs 和 gCCCs 的同样反应步骤，而其它则展现类似的趋势。例如，对于 ATP 分支，它们表明分支 A 及在一个较小的程度上分支 C 正在强烈地控制着。类似地，也表明了分支 A_{G6P}和 A_{FDP} 的显著控制。一个分支影响一个别的分支比影响另外又一个分支更强烈，这种趋势也被可靠地估计。第二，不符之处或者是由于实际动力学显著偏离大偏差理论所假定的线性化的动力学，或者是式（13.17）的矩阵近-奇异性。这必然与 K_i 参数中一个参数的被夸张的值相联系。在这种情况下，从这个特定的参数 K_i 计算出的 gFCCs 一般是不可靠的。例如，组 C_{PPH}的扰动常数比组 A 或组 B 的扰动常数要小得多，这种情况表明分支 C_{PPH}的 gFCCs 被低估了，正如表 13.7 中所证实的那样。第三，尽管努力试图把这些影响限定在每个分子内，对很差的 gFCC 估计的另一个原因是强烈的分支间的相互作用。由于某些代谢物广范围变化着的影响使得一般很难事先预测和避免这样的相互作用。在 13.6 节中提出了一种方法，其允许检测这些相互作用并进而设计随后的扰动以使这些相互作用最小。这种方法是基于 gFCC 确定所用的方程的特定结构及所产生的冗余。这些冗余主要允许人们进行自相一致性检验，并允许选择这样一些扰动，以能使冗余方程（质量守恒）的闭合度达到最大。组浓度控制系数加和定理需要全部 gFCCs 之和为零，就是闭合度最大（即质量守恒）的情况。可以看出，表 13.8 中 gCCCs 部分的一些数据组不满足这个判定准则。这是一个确实的信号，

一些估计的控制系数需要被校正。这种校正或者通过考虑一些附加扰动的结果来完成，或者在计算中包括多于所必需的最小扰动数并运用回归方法以确定控制系数来完成。

最后，值得注意的是：在反应 14 中同样的扰动被应用于表 13.8 所示的每一组计算。一个单个扰动对几个分支点的重复使用是由于围绕不同分支点的各组的自然重叠的结果。正如在下一节进一步所探索的，这种重叠不仅减少了阐述大网络所需的实验扰动的数目，而且允许人们集中于总网络的一小部分中关键反应的搜寻。

13.4 交叉代谢物反应组控制分析的扩展

在这一节，我们扩展自上而下法的应用，举例说明如何能从不同连接代谢物的 gFCCs 来获得交叉代谢物（intermetabolite）反应组及在某些情况下一些单个反应的 gFCCs。

13.4.1 扰动常数

正如在 13.2 节中引入的那样，扰动常数 K_i 定义：在围绕连接代谢物的每一个分支上，在组通量控制系数与分数通量变化之间的一种特殊的关系。具体地，式（13.8）表明：扰动常数 K_i 表征组 i 内的一个特定的实验扰动，而且 K_i 等于组通量控制系数 $^{*}C_i^{J_k}$（组 i 对任何其它组 k 的通量的影响）对 f_i^k-1（组 k 通量的分数变化）的比值。以不同的形式，同样的关系可以用于由通量变化和扰动常数来估计 gFCCs：

$$^{*}C_i^{J_k}=K_i(f_i^k-1) \qquad i,k\in\{A,B,C\} \tag{13.33}$$

扰动常数的重要性在于如下事实：其允许在组 i（产生扰动）与组 k（受此扰动影响）之间的基本的解耦。由于这种解耦，组 i 对组 k 的通量影响的 gFCC 被表示为：组 i 的普通扰动常数与由该扰动产生的组 k 的分数通量变化的乘积。这种解耦是 Small 和 Kacser 的大偏差理论的基本假定的直接后果，该理论已在 11.5 节论述过（Small and Kacser，1993a，b）。即，在一个分支网络中任何（单个的或组）反应具有式（11.69）所示的线性动力学形式，导致式（11.76）形式的通量。由于前一章的分组方法已经说明一个复杂网络可以作为一系列分支来处理，由此推断同样的形式也能用于描述一个复杂的网络。因此对于围绕一个连接代谢物的一个特定组 i 所计算出的扰动常数可用于确定同一组对任何其它任意组 k（或单个反应）的组通量控制系数 gFCC（或通量控制系数 FCC），只要后者的分数通量变化被测定就行。此外，如果组 i 由单一步骤组成，则该步对任何其它步骤影响的单一通量控制系数可用此式求得。

更重要的是，关于连接代谢物之间的一些反应组所施加的控制方面的信息不需更多的工作就能得到。通过比较这些重叠着的反应组的 gFCCs 值，就可得出连接代谢物间的短途径和一些单个反应对于目的通量的（g)FCC 值。一旦该控制结构的详细绘图工作已经完成，关键反应和途径的搜寻就变得很普通了。

13.4.2 多分支点上重叠反应组的分析

注意到，围绕一个分支点所形成的所有反应组中全部反应的总和必须包括一个网络中所有反应。因此，围绕不同分支点所识别的反应组仅仅通过对网络反应进行不同的分配即可形成。对邻近分支点的比较能够得到从一些单个分支点的分析所不易得到的信息，比如，确定连接代谢物之间的短的线性途径乃至一些单一步骤的控制系数。

这一点在图 13.2 中得到说明，它表示围绕图 12.6(a)所介绍的网络中的两个分支点的每个分支点所形成的反应组。在此网络反应中的四个反应的单个 FCCs 可直接由 gFCCs 确

定，因为这些步骤（1，3，4，5）每一个都可以围绕一个连接代谢物或其它构成一个完整反应组。比较起来，反应 2 与反应 4 和反应 5 共享图 13.2(a)中代谢物 B 的下游一个反应组，而它也与反应 1 和反应 3 共享图 13.2(b)中代谢物 C 上游的一个反应组。因此，与反应 2 相对应的通量控制系数从那个分支点的分析也不能直接确定。然而，从两个分支点所得出结果的同时运用允许通过 MCA 加和定理的应用来确定反应 2 的 FCC。实际上，反应 2 能被置于它自己的组（L）内，如图 13.2(c)所示。因为在图 13.2(c)中的其它四个组的 gFCCs 值可从两个分支点的分析中得到，L 组的 gFCC 仅仅是 1 与其它四组的 gFCCs 之和间的差。一般来说，如果 L 组在围绕上游连接代谢物分组时位于 C 组内而在围绕下游连接代谢物分组时位于 A 组内（见图 13.2），则 L 组对任何通量 J_k 的 gFCC 是：

$$^{*}C_{L}^{J_k}=1-\left({}_{\text{upstream}}{}^{*}C_{A}^{J_k}+{}_{\text{upstream}}{}^{*}C_{B}^{J_k}+{}_{\text{downstream}}{}^{*}C_{B}^{J_k}+{}_{\text{upstream}}{}^{*}C_{C}^{J_k}\right) \tag{13.34}$$

式中，upstream 表示上游；downstream 表示下游。

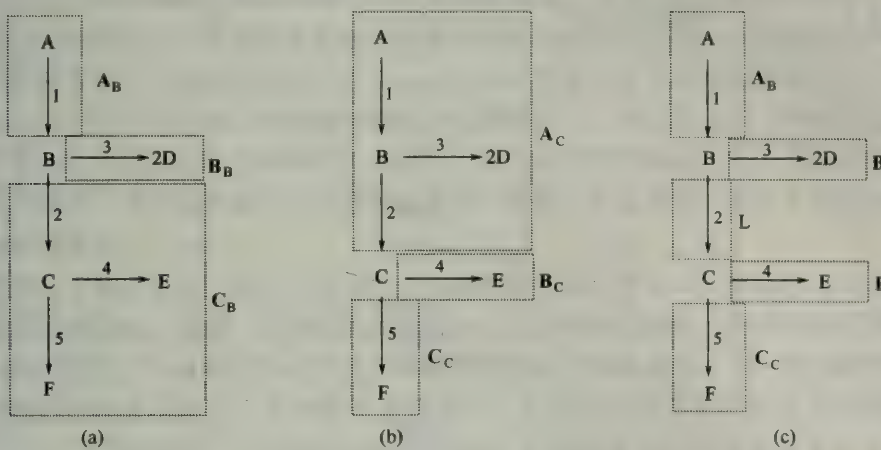


图 13.2 围绕两个连接代谢物的反应组的比较

(a)、(b) 围绕代谢物 B 和代谢物 C 形成的反应组；(c) 从围绕 B 和 C 的重叠反应组的比较所识别的反应组

通过应用式（13.34)，有可能确定网络中与任何交叉代谢物连接相对应的 gFCCs，即，把一种连接代谢物转化为另一种的任何途径。当结合用 13.2 节和 13.4.1 节的方法已经确定的组控制系数时，任何输入、输出途径或交叉代谢物连接对任何所测量的通量的影响的组通量控制系数（FCCs）可以被确定。最后，用这种信息就有可能将关键反应步骤（正如由这样的一个反应步骤对一个目的通量的 FCC 所度量）的搜寻缩小到仅仅具有充分大的 gFCCs 的这些反应组。另外，也应注意到，对于组浓度控制系数，一个类似的公式成立：

$$^{*}C_{L}^{X_k}=-\left({}_{\text{upstream}}{}^{*}C_{A}^{X_k}+{}_{\text{upstream}}{}^{*}C_{B}^{X_k}+{}_{\text{downstream}}{}^{*}C_{B}^{X_k}+{}_{\text{upstream}}{}^{*}C_{C}^{X_k}\right) \tag{13.35}$$

因为一个单一反应能够参加在几个不同的反应组中，在这样一个反应中，只要此扰动被限制在围绕每个连接代谢物的单一反应组内，而且此扰动产生对于其它反应组可测的通量变化，一个单一扰动就能够用来进行任何数量分支点的分析。从 13.2 节回想到，一个单分支点（例如，图 13.2 的代谢物 B）的分析通常需要三次扰动，其中每次应当是在不同的分支点。在此情况下，步骤 1 和步骤 3 需要扰动，但第三个扰动可在任何其它的步骤上进行。对第一个分支点（如代谢物 C）的下游的第二个分支点的分析也需要三次扰动，其中的两次必须在反应 4 和反应 5。因此，为了适当的分析这两个分支点，在步骤 1，3，4 和步骤 5（输入和输出步骤）中必须引入这些扰动。因此，围绕代谢物 B 的这些组可以用反应 4 或反应 5 作

为对组分 C 的扰动来进行分析。然而，因为来自这两种扰动的数据是可以利用的，这两种结果的比较提供了所得结果的一致性检验（见 13.6 节）。同样的逻辑推理对第二个分支点也成立。因此，很显然，对第一个分支点的分析已经需要的三个扰动增加一个单个的良好设置的扰动，不仅允许对第二个分支点进行分析，而且也对两个分支点提供了一致性检验。事实上，对一个复杂网络的完整分析通常所需要的策略上设置的扰动数目仅仅比分支点数目多两个。

13.4.3 实例研究

在这一节中，应用通过模拟实验扰动所获得的 gFCC 的估计值（见表 13.8）来计算交叉代谢物连接的 gFCCs 值。在表 13.9 中概括的所产生的 gFCCs 能用于指导我们对目的通量施加最大控制的一个（些）特定反应步骤的搜寻，为此目的所选择的通量是色氨酸释放的通量（反应 18）。

表 13.9 对色氨酸通量所估计的组浓度控制系数①

组 N	被扰动的步骤 i②	f_N^{18}	K_N	${}^*C_N^{J_{18}}$
A_{ATP}	—	—	—	0.05
B_{ATP}	8	1.109	-1.4	-0.15
C_{ATP}	14	1.177	6.2	1.10
$L_{ATP/G6P}$	—	—	—	1.70
A_{G6P}	—	—	—	1.60
B_{G6P}	3	1.010	-2.0	-0.02
C_{G6P}	14	1.177	-3.3	-0.58
$L_{G6P/FDP}$	—	—	—	0.75③
A_{FDP}	8	1.109	28.4	3.10
B_{FDP}	7	1.160	-0.74	-0.12
C_{FDP}	14	1.177	-1.9	-0.34
$L_{FDP/X/C}$	—	—	—	-0.27③
$A_{X/C}$	5	0.898	-19.0	1.94
$B_{X/C}$	14	1.177	-0.5	-0.09
$C_{X/C}$	17	1.075	-11.3	-0.85
$L_{X/C/PPH}$	—	—	—	-0.92
A_{PPH}	14	1.177	-14.4	-2.55
B_{PPH}	12	0.962	-1.3	0.05
C_{PPH}	17	1.075	0.27	0.02

① gFCCs 值以 ${}^*C_N^{J_{18}}$ 表示，通量扩增因子 f_N^{18} 和扰动常数 K_N 也列于表中。

② 反应号与图 12.1 中的序号一致。

③ 由于总和与 FDP 分支不吻合，所以这些值是在 A_{FDP}或 C_{FDP}中由扰动计算所得 gFCCs 值的平均值。

从这些结果清楚看出，G6P 任何一边的连接在色氨酸通量的控制中都很重要。与反应 4 相对应的 G6P/FDP 的连接显示了一个重要的 gFCC，其由反应 4（表 13.1）的实际 FCC 值所证实。另外，使分支酸转向预苯酸途径的连接与色氨酸的通量强烈地竞争着。因此，这些数据能得出这样的结论，色氨酸生产可通过如下方法被最好地改进：通过扩增糖酵解途径（即磷酸果糖激酶反应），或者通过削弱进入苯丙氨酸及酪氨酸的竞争性途径。

注意，在 13.3 节中所识别的那些夸大了的扰动常数，也使得这些表中的某些 gFCCs 值失真，正如以下事实所证实：对某些反应组这些系数不能正确地加和得出。然而，通过对 13.6 节中的更加精确的方法所证实的 gFCCs 进行比较，交叉代谢物连接的 gFCCs 值非常好的一致性估计确实能被得到。在下一节中我们会强调这些数据的价值：基于已知的控制系数，其描述一个一般的程序来优化特定通量的扩增。

13.5 通量扩增的优化

确定控制系数的主要目的是表征代谢网络的控制结构以便为有效的、有计划的通量扩增和重新分配提供一个坚实的基础。然而，对于最优的通量增强，如何最好地利用这些系数却不是立即就显而易见的。例如，在上节的实例研究所得到的磷酸果糖激酶（反应 4）的 FCCs 非常大的数值表明：这些特定步骤对色氨酸和苯丙氨酸的通量施加了最大的控制。遵循公认的知识，为了对氨基酸的过量生产产生所期望的效果，PFK 应该是活性扩增的主要目标。然而，用逐步增加的动力学速率来模拟这些反应显示：活性增加超过 11%，网络的结构妨碍着 PFK 的扩增。在更高的水平上，整个系统变得不稳定，不能收敛到稳态条件。

数学上，这种特殊的不稳定性的原因是在所关注的 PFK 扩增值处分叉进入一个空间，在此空间内代谢物分支酸的稳态实解不存在。换句话说，不存在可接受的胞内代谢物浓度来平衡分支酸的生产和消耗速率。出现这种现象的原因是，正如 12.1 节中所讨论的，消耗分支酸的反应的活性不足以平衡由于磷酸果糖激酶步骤的扩增所引起的分支酸的增产速率。尽管我们不能断言在一个类似地修饰过的 *S.cerevisiae* 菌株中这种情况会确实发生，但这种结果是对引入灾变的代谢扰动的典型细胞响应。在此情况下，代谢物分泌、降解途径的诱导以及分泌产物分布的剧烈变化通常都可以观察到。因为对这种不稳定性的、实际的细胞响应是高度不可预测的，首先最好避免引入这种的扰动。因此，优化通量扩增而又避免代谢不稳定的方法是所希望的。

限制网络不稳定性的一种方法就是引入一条额外的途径充当不受欢迎的（offending）代谢物的变换器或旁路。然而，这种方法是累赘的，而且倾向于除掉一种潜在的不稳定性又会产生另一种不稳定，而这种不稳定性又不得不用同样的方法来处理。另一种可能性就是将动力学的提高的程度减至最小，其最终可能是引起一系列问题而不是产生有用的结果（self-defeating）。一个更大胆的方法是设计这样的修饰，其将增加通过网络的通量而维持细胞内代谢物接近基态水平。这个战略扩充了 Henrik Kacser（Kacser and Acerenza，1993）最初提出的一项建议，即通量的扩增仅仅应当以这样的方式进行，其不允许胞内代谢物浓度有任何改变。这个假定的推论是为了在任何特定的途径中获得总通量的扩增，在其相应的独立途径中所包括的所有步骤必须依据某一准则进行扩增。而全部途径扩增这种需要完全是笼统的，在实际中这很少是可行的。在此我们的战略是放松那些阻止胞内代谢物浓度的任何改变这样的严格的限制。通过允许代谢水平的适度改变，可以表明仅仅从几个经过仔细选择的酶步骤的修饰就可得到整个网络通量的显著增加。

正如根据前面几节的方法所确定的，在 13.5.1 节所描述的最优化算法，可以利用组或单个通量控制系数。另外，因为它们提供了代谢物对反应速率修饰敏感性的一种量度，组或单个浓度控制系数是作为在最优化算法的关键参数而出现。这些概念及优化程序利用氨基酸生物合成途径进行了说明。为简单起见，该程序是用单个控制系数推导出的，尽管如此，这种方法用精确确定出的 gFCC 和 gCCCs 也应工作得同样好。

13.5.1 优化算法的推导

此处所论述的问题是最好的单个反应步骤，或者也许是最好的两个或三个反应步骤的确定问题，其应当被扩增以使网络的通量实现最大可能的增加，其服从所有的胞内代谢水平维持在其最初稳态值的合理范围之内这样一种限制。下面的优化程序不仅找出最好的反应以进行改变，而且对活性变化的上限或下限也提出建议。在同时改变两个或多个步骤的活性的情

况下，这些限制变得很关键。而且，优化结果对所允许的代谢物范围是相当不敏感的，只要代谢物浓度保持离开不稳定点附近。这是由于存在这样一个事实：一旦接近一个代谢物的分叉边缘，向网络不稳定性的发展就会发生得相当突然。这些简化允许将该优化简化成一个简单的、线性的形式。

通过大偏差理论（Small 和 Kacser，1993b）已经表明：网络中 L 个反应中的任何反应或全部反应的活性变化导致通量 J_k 的变化，$J_{k,L}$ 由下式给出：

$$f_L^k = \frac{J_{k,L}}{J_{k,0}} = \frac{1}{1 - \sum_{i=1}^{L} C_i^{J_k}\left(\frac{r_i - 1}{r_i}\right)} \qquad k \in \{1,2,\cdots,L\} \tag{13.36}$$

当式（13.19）所定义的活性扩增因子(AAF)r_i 进行优化后，就可得出最大通量变化值。通过改写前面的方程成如下形式，就可得出优化问题的目标函数：

$$1 - \frac{1}{f_L^k} = \frac{J_{k,L} - J_{k,0}}{J_{k,L}} = \sum_{i=1}^{L} C_i^{J_k}\left(\frac{r_i - 1}{r_i}\right) \qquad k \in \{1,2,\cdots,L\} \tag{13.37}$$

通量增加的程度取决于代谢物网络维持代谢物浓度在可容忍水平上的能力。根据 Small 和 Kacser（1993b），从任何数目的反应所改变的活性而导致的任何代谢物水平 c_j 的变化（$c_{j,L}$），可由下式得到：

$$\phi_L^j = \frac{c_{j,L}}{c_{j,0}} = 1 + \frac{\sum_{i=1}^{L} C_i^{X_j}\left(\frac{r_i - 1}{r_i}\right)}{1 - \sum_{i=1}^{L} C_i^{J_i}\left(\frac{r_i - 1}{r_i}\right)} \qquad j \in \{1,2,\cdots,K\} \tag{13.38}$$

显然，式（13.38）ϕ_L^j 的低限为 0，因为从物理意义上讲代谢物水平不可能是负值。尽管上面的边界是任意的，它是通过把 ϕ_L^j 的值限定在 2 而确定的，其提供了一个实际的探试的约束值，根据需要也可放松这个约束。因此，对浓度的限制变成：

$$-1 \leqslant \phi_L^j - 1 = \frac{\sum_{i=1}^{L} C_i^{X_j}\left(\frac{r_i - 1}{r_i}\right)}{1 - \sum_{i=1}^{L} C_i^{J_i}\left(\frac{r_i - 1}{r_i}\right)} \leqslant 1 \qquad j \in \{1,2,\cdots,K\} \tag{13.39}$$

从式（13.37）和式（13.39）可看出：以最小代谢物浓度变化的限制为条件的通量最大化的问题可以被定义为关于活性扩增参数（AAP）的线性约束优化问题。其定义为：

$$R_i = \begin{cases} \frac{r_i - 1}{r_i}, r_i \geqslant 1 \\ r_i - 1, r_i < 1 \end{cases} \qquad i \in \{1,2,\cdots,L\} \tag{13.40}$$

当反应 i 的活性被扩增时（$r_i \geqslant 1$），AAP 就等同于由式(13.36)～式(13.39)中所利用的 r_i 的实际的双曲函数；而当反应 i 的活性被减弱时（$r_i < 1$），其用一个线性函数来近似该函数。除了当 r_i 变得非常接近于零外，这种近似是很好的。用实例研究中 *S.cerevisiae* 的动力学模型进行广泛的模拟表明：此 AAP 的使用对竞争性反应减弱的影响提供了合理准确的预测。此外，由于物理上 AAP 的值被限定在 −1～1 之间，而且 r_i 必须为正，因而，AAP 是一个非常方便的优化参数。

AAP 的引入将消除从削弱竞争性反应（即，当 r_i 很小并且 $C_i^{J_k}$ 为负值）由式（13.36）所预测的过大的通量增加。同时，它允许目标函数和约束条件均以一个方便的线性形式被计算如下——确定 R_i 使得下式最大化

$$\sum_{i=1}^{L} C_i^{J_k} R_i \qquad k \in \{1,2,\cdots,L\} \tag{13.41}$$

根据被限制的代谢物变化的约束条件表示为：

$$\begin{aligned} &\sum_{i=1}^{L} (C_i^{J_i} \pm C_i^{X_j}) R_i \leqslant 1 \quad && \forall j \in \{1,2,\cdots,K\} \\ &-1 \leqslant R_i \leqslant 1 && \forall i \in \{1,2,\cdots,L\} \end{aligned} \tag{13.42}$$

必须强调的是：这个不等式的加和利用通量和浓度控制系数二者。注意到：式（13.41）和式（13.42）的加和扩展到网络的所有步骤，但仅对那些被调节的步骤包含着非零项。因此，对于单一步骤，加和包含一个单个非零项；如果是两步，则加和中有两个非零值，以此类推。

上述思维结构是一个线性优化问题，其可利用现有的技术进行求解以对每个生化反应步骤或同时考虑的多步骤组合得到最优的活性扩增。通过对一组、二组等内的反应步骤的所有组合所得到的最优通量进行比较，则最优的一个步骤或一些步骤的组合以及相应的最优活性扩增就可以被确定。另外，优化了的 AAP 表示活性变化的程度，而这种变化没有由于所扰动的代谢物水平而引起网络的不稳定性。

当单一步骤要进行修饰时，活性的变化应该是：R_i 与 $C_i^{J_k}$ 具有相同的符号，并且位于式（13.42）最严格的约束条件的边界上。这是优化问题的线性性质的结果。一般说来，这意味着步骤 i 的活性的最大变化由下式定义：

$$R_i = \frac{1}{C_i^{J_i} \pm C_i^{X_j}} \qquad i \in \{1,2,\cdots,L\}, j \in \{1,2,\cdots,K\} \tag{13.43}$$

因为对系统中的所有 K 个代谢物，R_i 都必须满足式（13.42）的限制条件，j 指的是展现式（13.43）中分母最大值的那些代谢物。然而，对每一种代谢物，如果这个分母的绝对值都小于 1，R_i 就能取其上限值或下限值（1 或 −1），它们分别代表对步骤 i 的无限扩增或完全移除；如果 n 个步骤的活性可以同时改变，这种优化就变成 n 维线性问题，其解则位于 n 个边界条件的交点处。实际上，为了确保对网络的响应的可靠预测，n 应限制在 3 左右。

13.52 节讨论了由该优化问题的这种公式表述所得出某些结果。具体地讲，规定通量足够的变化所需要的 R_i 的值也可能是超过式（13.42）的边界的一些数值。因此，最优的改变将是一个或两个反应的动力学的改变，以至于目的通量会受到强烈影响而代谢物浓度却不会受影响。

13.5.2 实例研究

用表 13.1 和表 13.2 中的控制系数，上一节所描述的优化程序被应用于 *S.cerevisiae* 系统中。可选定色氨酸的释放步骤（反应 18）作为通量优化的对象。表 13.10 概括了这个通量的单步和双步的优化结果。右栏中的值是通过式（13.41）和式（13.42）的优化程序得出的所预测的通量变化。实际上，这些预测值相当接近于通过所示步骤中的比例变化由完整的网络模型所得出的实际最大的稳态通量。

从表 13.10 以及表 13.1 和表 13.2 的控制系数可以看出：虽然 PFK（反应 4）很显然是一个限制反应，如果一个单个步骤要被扩增，最好是完全除掉步骤 7，这一步是生产甘油的竞争性分支步骤；或者使步骤 14 的活性增至 3 倍，该步骤生产色氨酸；或者使步骤 18 的活性增至 6 倍，该步骤释放色氨酸。对于 PFK 的大的 FCC 可通过对于代谢物分支酸的一个很大的 CCC 来被有效地废弃，这里分支酸限制着 PFK 的可允许的动力学扩增。事实上，反应 7、14 和反应 18 对色氨酸生产是明确地作为最优的单个步骤而出现的，因为这些步骤能给

可允许的扩增量（由 CCC 来度量）与每扩增单位对网络通量的影响（由 FCC 来度量）二者之间提供最好的平衡。而且，根据式（13.42）的限制条件，只有那些展现适中的浓度控制系数的步骤才能任意地被扩增或减弱到任何水平。然而，使色氨酸通量增加 20%～30% 的 4 个不同步骤的识别提供了不存在单一的速率限制步骤的进一步证据。

表 13.10　色氨酸通量扩增的最优步骤

被调节的步骤 i①		活性扩增 r_i		色氨酸通量扩增 $f^{J_{18}}_{k}$
7		0		1.37
14		3.19		1.27
18		5.99		1.27
15		0.57		1.21
4		1.09		1.16
16		0.60		1.13
5		1.72		1.12
4	14	1.17	50.4	2.25
14	16	∞	0.27	2.07
4	18	1.16	∞	1.96
15	16	0.37	0.2	1.95
14	17	∞	0.42	1.89
11	14	0.5	∞	1.86
16	18	0.33	∞	1.80

① 反应号与图 12.1 中的序号一致。

在此网络中，分支酸的浓度控制系数如此大以至于几乎网络动力学的任何变化都使分支酸的水平产生相当大的变化。因此，分支酸分支点形成一个颈缩点（constriction point），而且被认为是一个关键分支点。在任何这样的分支点附近，有必要限制活性改变的大小以便使代谢物维持在一个可接受的水平。如果目的是发生分叉的分支点处增加通量，三种可能的单一步骤活性扰动可能是有效的：(a) 通过上游分支增加代谢物的生产速率；(b) 通过下游目的分支增加代谢物的消耗速率；(c) 通过竞争性的下游分支来降低代谢物的消耗速率。这三种情况在图 13.3(a)中进行了说明。

当两个步骤的活性能被同时改变时，优化过程预示进入色氨酸的通量可被近似加倍。然而，能够形成这些反应对的步骤的选择并不是任意的，而是围绕关键分支点遵循一组模式以便调节连接代谢物的水平。在此情况下，所表示的那些反应对几乎总是包括扩增下游目的途径，即或者是 (a) 扩增上游分支或者是 (b) 减弱竞争性的下游分支，因而将代谢物转向目的分支。通常，在围绕颈缩点的同一分支内调节两个反应不会大大提高目的通量，减弱竞争性分支的通量也不能扩增上游分支的通量，因为这只能增加连接代谢物的累积。反应对同时调整的可接受类型如图 13.3(b)所示。

通过两个改变的步骤进行分支酸水平的调节可用反应对 4/14 举例说明，其是色氨酸生产的最优选择之一。本质上，这种配对的影响是使分支酸的水平适中，这可通过离开（反应 14）压倒性的碳通量的分支酸部分来进行，而压倒性的碳通量是通过 PFK 的扩增而被推进分支酸的。因此，一个反应的调节用来减轻代谢的不稳定性，而又是由第二个反应的扩增以另外一种方式引起的。此外，反应配对允许对每个配对反应比它们单独时扩增得更彻底。除了 15/16 反应对之外，表 13.10 中的其它反应对中的每一对均符合图 13.3 所描述的模式。

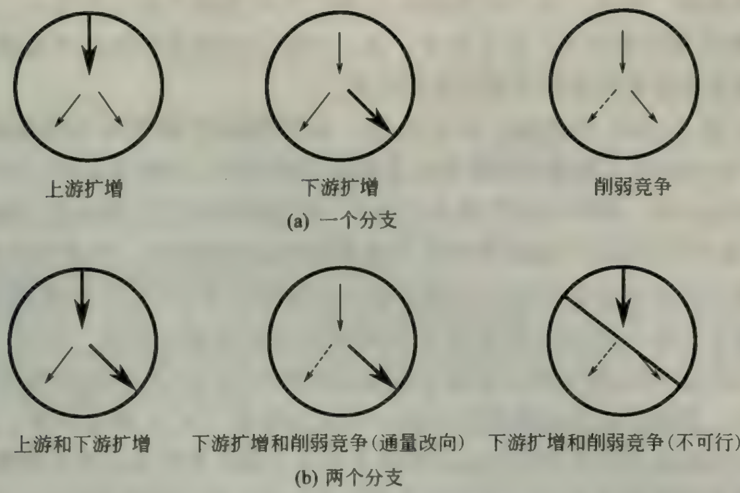


图 13.3　关键分支点下游的通量扩增

基于围绕关键分支点的单个分支（a）或两个分支（b）的扩增（粗线箭头）或削弱（虚线箭头）的扩增通量的一些可接受的方法。注意，在（b）中的三种组合中的两个是可以接受的，但是第三种组合不能适当地调节连接代谢物的水平，因此是一个不可以接受的选择

最后一点对于涉及多于两个步骤的同时扩增的可能性问题是必要的。一般情况下，如果扰动一个分支中的单一步骤就足以达到式（13.42）中所表示的浓度限制条件，在那个分支中就不再允许更进一步的活性变化。在几个步骤可以被扩增而没有达到这些限制条件的这种不大可能的情况下，应该在网络中别处做一些另外的活性改变的工作。具有一个单一颈缩点(通常通过 CCCs 的大小来识别)、如下情况是不可能发生的：在多于两个分支点上发生活性变化将是有必要的。如果两个不同的颈缩点已被识别出，在调节颈缩代谢物水平时，两个或三个分支必须被扩增，以扩增该网络的通量。一般，由于代谢网络的非线性性质，为了避免未预料到的不稳定性，最好是限制一次只对两个或三个步骤进行同时调节。之后，一旦一种稳定的突变已经得出并显示出所期望的通量扩增，就可考虑第二轮的通量分析与优化。通过对一些关键步骤的协同调节，接下来进行重复的分析与优化就能达到合理的过程改进。

13.6　一致性检验与实验证实

在 13.2 节，我们描述了一种从通量测量来计算组通量控制系数的方法，并且提供了对芳香氨基酸实例研究中 gFCCs 计算的举例说明。所产生的 gFCCs（如表 13.8 所示）展现了与表 13.3～表 13.7 中解析得出的 gFCCs 值定性一致，不过总的定量一致是缺乏的。从单个的 FCCs 计算所得出的 gFCCs 值（正确的）与应用整个生物反应网络进行模拟的实验扰动所确定的这些值之间的不符合之处是由于两个主要的原因。第一，对应于产物或底物浓度的不同反应步骤的动力学可能偏离大扰动理论中所假定的线性形式；另外，如果一个反应的动力学除了底物和产物之外还依赖于效应物的水平，则其速率曲线也不会呈现所假定的线性形式。第二，超出通过连接代谢物所允许的分支之间的直接相互作用［分支间的对话交流(interbranch cross-talk)］可以使在反应组的公式表示中和在仅由通量计算组系数的伴随表达式的推导中自上而下法本身固有的基础变得无效。事实上，代谢效应物或抑制物的存在能够有效地绕过连接代谢物并且引入分支间的在本章所介绍的公式当中也没说明原因的影响。例如，在实例研究中所使用的模型，反应 9 的动力学（表 12.2）包括由苯丙氨酸、酪氨酸

和色氨酸的反馈抑制。因此，在对插在反应 9 和三种氨基酸产物之间的分支点（即，分支酸/5-磷酸木酮糖及预苯酸节点）的分析中，上、下游之间的直接相互作用将可能会产生非线性动力学，进而导致通量控制系数的错误计算。

正如 Small 和 Kacser（1993b）所讨论的，动力学的非线性不会导致由大偏差理论（11.5 节）所计算出的单个通量控制系数显著歪曲了的估计。原因是这种方法是基于已表征的扰动，即在扰动点处，酶活性的扩增是已知的。在此种情况下，由于分支间的强烈的相互作用，在 FCC 估计中的误差可能仅仅产生于通量的不适当的使用。当使用足够小的扰动时，这种相互作用及相关的误差就会减小，因此也就会提高所得的 FCCs 的精确度。另一方面，在反应组的情况下，每一扰动的酶活性变化通常是不知道的。因此，由式（13.17）和式（13.18）所给出的 gFCCs 值本质上是通过对实验数据应用 MCA 的加和和分支定理来确定的。在此过程中，表征产生实验扰动大小的一个扰动常数（K_i）可被计算。gFCCs 可在式（13.18）中用这样的扰动所影响的反应组的通量变化去乘产生扰动的扰动常数就可确定。显然，动力学的非线性以及交叉-相互作用将会使这些 gFCC 估计值失真。

在本节中我们提出这些问题。由于通常不容易观察到这些影响，我们的重点是放在自身一致性检验的发展方面，这种检验可被用来评估 gFCC 估计的精确度，并且通过设计减少相互影响的扰动来帮助提高精确度。

13.6.1 利用多次扰动发展一致性检验

前面曾提到，动力学的非线性并不会显著地影响用大偏差理论由已表征的扰动计算 FCCs。类似地，如果一个分支中的活性变化是知道的，那么由式（13.21）所确定的 gFCCs 值是相当可靠的。因此，将从反应 3（见表 12.13）的已表征的扰动所求出的 6-磷酸葡萄糖分支点的 gFCCs 值，与表 12.9 中正确的 gFCCs 值进行比较，表明极好的一致。在 ATP 分支点的情况下，在反应 8（见表 13.8）中的扰动结果与表 13.3 中实际的 gFCCs 进行类似的比较，其结果是不太满意的。其中最大系数被低估 50%。这些错误进一步影响了其余分支的 gFCCs 的计算。

幸好，如果在同一个分支中引入多于一个扰动，这样的误差存在就可被发现。分支 i 中，两种不同的扰动（由下标 1 和下标 2 表示）会导致两组不同的通量变化（由 p_i^j 度量），并且因而也得出两个不同的扰动常数值；然而，理想地，它们的乘积应当产生相应的 gFCCs 的等同估计。正如能从式（13.18）所看到的，当且仅当最后的分数通量变化是互相成比例的，由分支 i 中的二次不同的扰动所计算的两组 gFCCs 将是一致的：

$$\begin{bmatrix} {}^*C_i^{J_A} \\ {}^*C_i^{J_B} \\ {}^*C_i^{J_C} \end{bmatrix} = \left(K_i \begin{bmatrix} p_i^A \\ p_i^B \\ p_i^C \end{bmatrix} \right)_1 = \left(K_i \begin{bmatrix} p_i^A \\ p_i^B \\ p_i^C \end{bmatrix} \right)_2 \qquad i \in \{A,B,C\} \tag{13.44}$$

作为式（13.44）的一个结果，存在着两种扰动的一致性的清楚的检验，这样以至于：

$$\frac{(p_i^A)_1}{(p_i^A)_2} \approx \frac{(p_i^B)_1}{(p_i^B)_2} \approx \frac{(p_i^C)_1}{(p_i^C)_2} \qquad i \in \{A,B,C\} \tag{13.45}$$

注意，式（13.45）的比是通过通量变化可直接观察到的。这些比值的差异会表明，网络对扰动不一致的响应，其已被假定是可以直接相比的。由于分支点上的物质平衡限制了一个分支的通量变化，只需要两个通量来表示式（13.44），因此可很容易地将其用图表示在二维平面上。这样，对每一个扰动，一个单一的特征角 θ_i 可以被定义为（Simpson et al,

1998)：

$$\theta_i=\tan^{-1}\left(\frac{p_i^{\mathrm{C}}}{p_i^{\mathrm{B}}}\right)\qquad i\in\{\mathrm{A,B,C}\}\tag{13.46}$$

而不同扰动的特征角可进行如下比较：

$$(\theta_i)_1\approx(\theta_i)_2\approx(\theta_i)_{\mathrm{actual}}\qquad i\in\{\mathrm{A,B,C}\}\tag{13.47}$$

式中，$(\theta_i)_{\mathrm{actual}}$为实际扰动的特征角。

方框 13.1　通量控制系数的图解表示

对任何特定的分支点，可以定义 9 个组通量控制系数，其度量三条分支中的每一分支的一个扰动对三个组通量中的每一个的影响。与任一分支 i 的一个扰动相对应的三个 gFCCs 可用三维中的一个矢量表示：

$$^*\vec{C}_i\equiv(^*C_i^{J_\mathrm{A}},{}^*C_i^{J_\mathrm{B}},{}^*C_i^{J_\mathrm{C}})\qquad i\in\{\mathrm{A,B,C}\}\tag{1}$$

事实上，只需二维就可表示一个分支点的通量控制系数。这是连接代谢物稳态质量平衡的结果，其允许 A 组的 gFCC 与其它两个分支的 gFCCs 用下式相关联：

$$^*C_i^{J_\mathrm{A}}=\frac{J_{\mathrm{B},0}\,^*C_i^{J_\mathrm{B}}+J_{\mathrm{C},0}\,^*C_i^{J_\mathrm{C}}}{J_{\mathrm{B},0}+J_{\mathrm{C},0}}\qquad i\in\{\mathrm{A,B,C}\}\tag{2}$$

因此，组通量控制系数能在二维平面（$^*C_i^{J_\mathrm{B}}$，$^*C_i^{J_\mathrm{C}}$）上充分地表示。如果对起源于三个分支中的每一个的三个扰动相对应的 gFCC 矢量进行头尾相接，加和定理可表示为：

$$^*\vec{C}_\mathrm{A}+{}^*\vec{C}_\mathrm{B}+{}^*\vec{C}_\mathrm{C}=(1,1,1)\tag{3}$$

这表明：该平面的终点应当是点（1，1）。此外，如果一个组内每个反应的单个通量控制系数均类似地标绘，很清楚它们的矢量和一定会得出相应的 gFCCs。这在图 13.4 中进行了说明，该图显示了相应于实例研究中预苯酸分支点的单个及组通量控制系数。

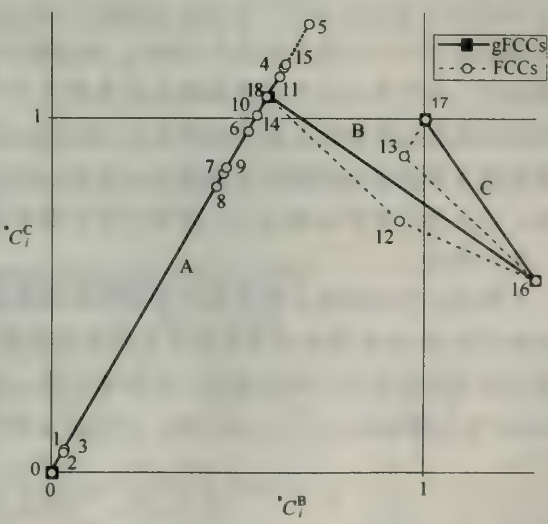


图 13.4　氨基酸生物合成网络中预苯酸分支点控制系数示意

每个矢量的大小反应了相应的反应，或组对一个特定组通量的控制程度。实线代表相应于三个组通量控制系数的矢量 $^*\vec{C}_i$。虚线代表组成每个 gFCC 的单个 FCCs 的矢量。空心圆点旁边的数字指的是最近增加的矢量的反应。因此，相应于组 B 的矢量（$^*\vec{C}_\mathrm{B}$）是反应 12 和反应 16（分别是 $\vec{C}_{12}$和 $\vec{C}_{16}$）的贡献之和。反应号与图 12.1 中的序号相对应

图 13.4 中每一矢量的角表明一个特定的分支点是如何响应于分支 i 的一个扰动的。例如，如果某一矢量是非常平的（即，具有一个接近于 0°的特征角）。它表示分支 i 对分支 B 的通量比对分支 C 有更大的控制。矢量 A 的特征角介于 0°与 90°之间说明增加了分支 i 的活性将增加分支 B 和 C 的通量。另一方面，矢量 A 特征角在 90°与 180°之间或 −90°与 0°之间则暗示一个分支中通量的增加将伴随着发生其它分支的通量减少。

式（13.44）表明，未知的 gFCCs

与引入扰动所获得的通量变化成比例。因此，极为重要的是实验的通量变化是平行于实际的 gFCCs 的特征方向的。对前面图中所举例的那个分支点，很显然，对分支 A 内的任何扰动都应该满足这种要求，因为每一个单个的 FCC 投向几乎相同的方向。另一方面，构成组 C 的两个反应的 FCCs 有完全不同的方向。结果，如果这些方向中的任何一个被用来估计特征角，将会得出组 C 中一个扰动的特征角的不正确的估计，进而得出不正确的 gFCCs。在此情况下，需要更多的扰动，包括一些已特征化的扰动。

因为在 gFCC 计算中仅有 3 个自由度，因此利用 3 个实际的特征角的知识就足以确定所有的 9 个组通量控制系数。然而，由每一个扰动所确定的特征角只是近似于相应分支的实际特征角。因此，有必要或者从多次扰动求得一些一致的特征角，或者从已特征化的扰动确定一个或多个分支的特征角。一个一致的特征角可以是两个或多个扰动特征角的平均值，但这些特征角不应相互差别很大。一旦应用其中的一种方法独立地证实了某些特征角，其余的未知量就可根据这些更加可靠的值求出，而不是利用那些原始的扰动数据。因此，如果这个角被假定为 ϕ_i，就可定义一个代表性的扰动（representative perturbation）以取代 gFCC 计算中的实际扰动（actual perturbation），如下式：

$$\begin{bmatrix} p_i^{A} \\ p_i^{B} \\ p_i^{C} \end{bmatrix}_r = \begin{bmatrix} \dfrac{J_0^{B}+J_0^{C}\tan\varphi_i}{J_0^{B}+J_0^{C}} \\ 1 \\ \tan\varphi_i \end{bmatrix} \qquad i\in\{A,B,C\} \tag{13.48}$$

在确定这样一个一致性角或平均角 φ_i 的过程中，从不同的扰动实验所得出的特征角不能差别很大。我们多少有点任意地限定此差别为 5°左右。如果可以得到任何 gFCCs 值的可靠估计值（比如由已特征化的扰动得出），式（13.13）的加和定理可以重新构建以包括这些值，其余的系数就可从产生的方程确定。然而，因为一个未知系数会减少一个方程组的一个自由度，其余的系数要么通过三个原始平衡方程中的两个计算得出，要么从所有三个平衡的最小二乘法算出。

一个特定分支内的两个扰动可以展现明显不同的不能被协调的特征角，这是那个分支动力学的非线性和/或者该分支与其它分支间强烈的相互作用的证据。在此情况下，使用一个代表性的扰动是有用的，该扰动是二者的集合体。通过利用分支 i 中的两组实验扰动$(p_i^k)_1$和$(p_i^k)_2$的平均值的形式，式（13.48）中所假定的特征角可以是如下形式：

$$\varphi_i = \tan^{-1}\frac{1}{2}\left[\frac{(p_i^{C})_1}{(p_i^{B})_1}+\frac{(p_i^{C})_2}{(p_i^{B})_2}\right] \qquad i\in\{A,B,C\} \tag{13.49}$$

对这样一个平均值的一个替代选择是在该分支内用一个或多个已表征化的扰动从求取该分支中的各个单一步骤的 FCC，之后，该分支的 gFCCs 就可通过适当的加和求出。此外，即使当一个分支的所有单个 FCC 不能被确定时，只要该分支中的其它步骤不与反应 i 显著地竞争（即，其它步骤的特征角类似于反应 i 的特征角），从位于该分支中的任何反应 i 的已表征扰动所求出的一个 FCC 通常也可提供该分支中 gFCC 的低限。最后，如果在单一反应 i 中的两种不同扰动导致通量变化，其展现出根本不同的且不能被协调的特征角，则按如下方法进行可能是有帮助的，即仅仅利用其它扰动的结果并从其它已知的 FCC 值通过加和定理确定反应 i 的 FCCs。

在应用 13.2 节的方法确定 gFCCs 值的过程中，由于式（13.17）的矩阵求逆会出现进

一步的困难，特别地，如果矩阵是几乎奇异的，所产生的扰动常数就会被明显夸大，这会得出非常大的 gFCCs 值。回忆一下在表 13.8 中，过大的扰动常数值和 gFCC 的估计值从几组计算产生了（尤其对最后三个分支点）。求逆后矩阵的近-奇异性一般产生于对该分支点的小扰动的运用。事实上，无论什么时候只要大于 5～10 的 K_i 值产生，最好是尝试进一步的实验或者用像前面描述的那样使用有代表性的扰动。如果必要的话，可以利用更多的控制系数平衡以便限定扰动常数的值。在式（13.17）表述中，用了三个这样的平衡：围绕分支点的两个独立通量的加和定理以及分支点处的分支定理。其它的两个加和也可加到这些平衡中，以产生一个超定系统，从该超定系统，扰动常数 K_i 可用回归来确定。这些方程是对于独立于该分支点的任何通量或任何代谢物浓度（包括相应的连接代谢物的浓度）的 FCC 和 CCC 的加和定理。对任何独立通量 J_k 或浓度 c_j，这些方程可取如下形式：

$$K_A p_A^k + K_B p_B^k + K_C p_C^k = 1 \qquad k \in \{1,2,\cdots,L\} \tag{13.50}$$

$$K_A \pi_A^j + K_B \pi_B^j + K_C \pi_C^j = 0 \qquad j \in \{1,2,\cdots,K\} \tag{13.51}$$

在这些方程中，p_i^k 为从分支 i 的一个扰动引起的通量 J_k 的比例变化，如式（13.12）所定义，而对于浓度的变化 π_i^j 可类似地定义为：

$$\pi_i^j = \frac{c_{j,i}}{c_{j,i}} - 1 = \phi_i^j - 1 \qquad i \in \{A,B,C\},\ j \in \{1,2,\cdots,K\} \tag{13.52}$$

如果对于上游分支（A）进入节点的通量没有可看出的影响，这些附加的平衡可能也是很有用的，因为式（13.16）中平衡定理的运用会处于困境。在此情况下，对分支点的连接代谢物的加和定理的应用将会产生最好的结果，因为该系统动力学的非理想状态变得更可能远离该分支点。

13.6.2 对预苯酸分支点的应用

上述想法利用 *S.cerevisiae* 实例研究中的围绕预苯酸分支点的多次扰动而被举例说明。表 13.11 表明围绕该分支点的六个扰动的影响，该扰动是在模拟试验中通过六个不同动力学步骤的活性的变化而实现的。

表 13.11 围绕预苯酸分支点的多个扰动的影响①

扰动			通量 J_k 的变化			特征角 θ_i
组	反应 i②	r_i	J_A	J_B	J_C	
A	8	2.0	−0.038	−0.026	−0.048	61.6°
A	18	0.5	0.050	0.034	0.0645	62.2°
B	12	1.5	0.00	0.15	−0.14	−43.0°
B	16	1.5	0.0345	0.15	−0.075	−26.6°
C	13	1.5	0.003	−0.139	0.137	135.4°
C	17	1.5	0.033	0.023	0.043	61.8°

① 反应 i 的扰动导致通量 J_k 的比例变化 p_i^k。

② 反应号与图 12.1 中的序号一致。

从表 13.11 中的数据可清楚看出，在 A 组中两个扰动产生了具有非常相似的特征角通量的变化。因此，一个 62°的一致的特征角似乎适合于此组。在 B 组中的两个扰动的特征角表明有些不一致，但是如果必要的话，可以依据式（13.49）加以平均。然而，由于在 C 组中的扰动表现出极端不同的特性（正如在方框 13.1 中所示的），因此，进一步研究那个分支点的反应是慎重的。因为在反应 13 和反应 17 中扰动的活性扩增因子已经知道，式（13.20）可以用来求相应于这些反应的每一个对组通量影响的 FCCs。反应 13 的扰动对分支 A、B 和

反应 C 上产生的 FCCs 值分别为 0.01，−0.37 和 0.36，而反应 17 扰动所产生的 FCCs 值分别为 0.09，0.07 和 0.12。对于分支 C 中的扰动的组通量控制系数可通过对反应 13 和反应 17 的上述的 FCCs 值求和得到，得出如下结果：

$$
\begin{aligned}
{}^{*}C_{C}^{J_{A}} &= 0.10 \\
{}^{*}C_{C}^{J_{B}} &= -0.30 \\
{}^{*}C_{C}^{J_{C}} &= 0.48
\end{aligned}
\tag{13.53}
$$

可利用 MCA 的分支理论以便由 ${}^{*}C_{B}^{J_{A}}$ 和 ${}^{*}C_{C}^{J_{A}}$ 直接确定已知的通量：

$$
{}^{*}C_{B}^{J_{A}} = {}^{*}C_{C}^{J_{A}}\left(\frac{J_{B,0}}{J_{C,0}}\right) = 0.10 \times \frac{3.52}{3.72} = 0.09 \tag{13.54}
$$

将这些结果代入式（13.13）的加和定理公式中，并利用分支 A 的一致角，得到下面的关系：

$$
\left.
\begin{aligned}
1.45K_{A} + 0.09 + 0.10 &= 1 \\
K_{A} + {}^{*}C_{B}^{J_{B}} - 0.30 &= 1 \\
1.88K_{A} + {}^{*}C_{B}^{J_{C}} + 0.48 &= 1
\end{aligned}
\right\}
\tag{13.55}
$$

三个方程中的三个未知数可很容易求出，得出其余的 gFCCs 值，如表 13.12 所示。

表 13.12 与表 13.7 中 gFCCs 的所示的精确值比较表明，一致性非常好。注意，主对角线系数均是正的，没有哪个系数是显著大于 1，这就意味着这些系数在物理上都是合理的。

表 13.12　预苯酸分支点证实了的组通量控制系数

被扰动的分支 N	通量 ${}^{*}J^{k}$ 的 gFCC		
	J_A	J_B	J_C
A	0.81	0.56	1.05
B	0.09	0.74	−0.53
C	0.10	−0.30	0.48

注：gFCCs 以 ${}^{*}C_{N}^{J_{k}}$ 的形式表示。

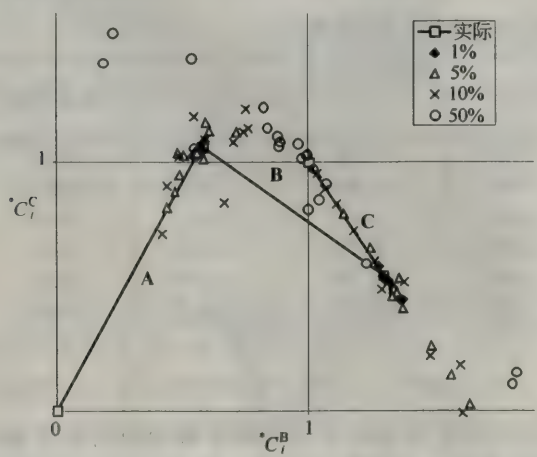


图 13.5　测量误差对围绕预苯酸分支点的 gFCCs 计算的影响

直线代表实际组通量控制系数。分散的数据点代表在每次通量变化的测量中通过假定 1%，5%，10% 或 50% 的随机统计误差而计算出的这些线的终点

最后，利用表 13.12 中由加和定理独立得出的分支 B 的 gFCCs 值，求出组 B 特征角为 −35.6°，其位于表 13.11 所列组 B 扰动范围的中间部分。因此，即使在表 13.7 中的实际系数值不能用于比较的目的，这些 gFCCs 值会被认为是相当合理的。

13.6.3　测量误差的影响

通量及通量变化的精确测量对于这些方法的成功实施是很有必要的。实际上，测量中的随机误差对于模拟非线性关系的 gFCC 计算有很大影响。因此，为了减小测量误差，确定非理想因素是否确实存在，有必要进行重复测量和证实这些测量。

随机测量误差的影响如图 13.5 所示。此图中所描绘的每个数据的计算都是遵循 13.2.1 节的方法进行的，它利用反映

(mirroring) 分支点的 gFCCs 值的理想特征角的扰动，并具有能被引入每个通量测量的随机统计误差。重要的是要认识到，即使 5%～10% 的误差水平也会导致相当大的偏离了的结果。还应注意，由于分支 B、C 中扰动的特征角是类似的（但方向相反），相应于这些扰动的 gFCCs 值往往引起比分支 A 中的相应值过低或过高的估计。这是式 (13.17) 中求逆后的矩阵近-奇异性的结果。不同水平测量误差结果的比较表明，10% 的误差允许 gFCCs 很好地定性估计。但对于很好的定量评估，必须将误差水平控制在 5% 以内。然而，由于通量测量的精确度会超出实验者的控制范围，因此，改进控制系数估计精确度的最好办法是通过对多个扰动实验结果的回归分析。

参 考 文 献

Kacser, H. & Acerenza, L. (1993). A universal method for achieving increases in metabolite production. *European Journal of Biochemistry* **216**; 361-367.

Reder, C. (1988). Metabolic control theory: a structural approach. *Journal of Theoretical Biology* **135**; 175-201.

Small, J. R. & Kacser, H. (1993a) Responses of metabolic systems to large changes in enzyme activities and effectors. Ⅰ. The linear treatment of unbranched chains. *European Journal of Biochemistry* **213**; 613-624.

Small, J. R. & Kacser, H. (1993b) Responses of metabolic systems to large changes in enzyme activities and effectors. Ⅱ. The linear treatment of branched pathways and metabolite concentrations. Assessment of the general nonlinear case. *European Journal of Biochemistry* **213**; 625-640.

Simpson, T. W., Shimizu, H., & Stephanopoulos, G. (1998). Experimental determination of group flux control coefficients in metabolic networks. *Biotechnology & Bioengineering* **58**; 149-153.

Stephanopoulos, G. & Simpson, T. W. (1997). Flux amplification in complex metabolic networks. *Chemical Engineering Science* **52**; 2607-2627.

第 14 章　细胞过程热力学

前几章对细胞反应过程的分析仅仅基于计量学和动力学。在第 7 章中举例说明了如何根据对胞内代谢物的化学计量约束产生某一普遍转化过程的所有可能途径。在第 8 章～第 10 章介绍了由化学计量学模型和胞外代谢物及同位素标记分布的测量计算，通过不同细胞途径的胞内代谢通量的方法。最后，在第 11 章谈到了动力学控制的问题，并得到了以控制系数的形式来表征某一反应，或一组反应（第 12 章、第 13 章）所施加的控制程度。到目前为止还没有考虑到细胞反应的另一重要方面，也就是热力学方面，它研究各个细胞反应或整体代谢途径的可行性。这就是本章要研究的内容。主要讨论两个问题：第一，单个反应或整个代谢途径的热力学可行性。后者对于评估由第 7 章介绍的方法计算得到的大量化学计量学上可能的途径非常有用。第二，虽然热力学主要针对平衡过程，其向非平衡过程的推广可以为从开放系统角度描述生物过程动力学提供有用的信息。这使得描述生物反应动力学成为可能，由此得到速率信息以通过代谢控制分析定理确定各种控制系数。在对热力学基本原理作一简短介绍后，将在本章举例说明上述热力学的应用。

14.1　热力学原理：综述

热力学分为平衡态热力学（或经典热力学）和非平衡热力学。经典热力学只考虑平衡状态，因此对发生在细胞途径的转化过程的特性并不能提供很多帮助。热力学第二定律和吉布斯相平衡原理一起可以描述某一反应或转化过程是否可沿某一方向进行，即是否可行等（见 14.2 节），但却不能描述反应速率。它们主要应用于封闭系统中的可逆反应，最终都不可避免地达到平衡态。然而生命系统却是开放系统，因此永远不会达到平衡。通过将高焓低熵的底物转化为低焓高熵的代谢产物，它们不断获得自由能。由底物到产物的转化经由许多单独的反应步骤完成，其中某些步骤接近平衡态，另一些则远离平衡。在 EMP 途径中，一些反应步骤接近平衡，例如磷酸葡萄糖异构酶、三磷酸甘油酸变位酶和烯醇酶催化的反应，而另外如己糖激酶、磷酸果糖激酶、丙酮酸激酶等催化的反应则远离平衡。在本节介绍的热力学原理在细胞过程的应用中，仅考虑平衡热力学，而在 14.3 节将处理非平衡热力学问题。

在热力学中，系统被定义为宇宙中我们感兴趣的部分，例如一个生物反应器或一个细胞，而其它部分都作为它的环境。系统被称为开放或封闭取决于其是否可与环境交换物质和能量。因为活细胞利用营养物质、释放代谢产物并产生功和热，因此它们是开放系统。系统状态由一组状态函数所定义。这些状态函数包括内部能量（U）、焓（H，等于等压条件仅有的功的类型，即由于体积变化时吸收的热量）、熵（S，系统混乱度的测量）。这些状态函数可用于描述和解释两个热力学定律，经典热力学就是基于这两个定律建立的。这两个定律做如下假定。

- 热力学第一定律　能量不能被产生或消除，用数学方式表达为：$\Delta U=0$。
- 热力学第二定律　自发过程只能按使宇宙熵增加的方向进行，用数学方式表达为：$\Delta S>0$。

热力学第一定律阐明了任何过程都是能量守恒的，也就是说系统产生的能量必须由环境

吸收。第二定律阐明了过程的自发性取决于熵的变化。在研究细胞过程时自发性是一个非常重要的问题，但是由自发过程导致的宇宙无序化对评估自发性并不实用，因为确定整个宇宙的熵变化是不可能的。另外，过程的自发性不能单独由所研究系统的熵变化决定，因为即使在系统熵减少的情况下一个放热过程也可能自发进行（当然宇宙总熵还是增加，因为环境熵的增加足以平衡系统熵的减少）。例如失活蛋白可自发折叠成其高度有序的原始构象。

由于熵使用的这些困难，自发性可由另一状态函数——吉布斯自由能确定：

$$G = H - TS \tag{14.1}$$

这是由 J. Willard Gibbs 于 1878 年提出的。自由能的意思是，对一个等温和等压的过程，系统所做的最大功（不包括功的转移）与系统的自由能的减少量相等。大多数的生物系统都可作为等温和等压过程，其自发性的标准是 $\Delta G \leqslant 0$。

自发过程，也就是 $\Delta G \leqslant 0$ 的过程，被称为外源的（exogenic），它们可以用来做功。非自发过程，也就是 ΔG 为正的过程，被称为吸能的（endergonic），它们必须通过吸收自由能来推动。处于平衡态的过程其正向过程和逆向过程正好处于平衡，其 $\Delta G = 0$。要注意到吉布斯自由能随温度而变化，因此在使用时一定要注明温度。对温度的依赖性可以解释为何在高于一定温度时蛋白质会自发变性。如前面提到的，从变性状态形成自然状态的蛋白质的过程 ΔH 和 ΔS 均为负，但它们以不同速率随温度变化。在一定温度下 ΔH 等于 $T\Delta S$，在该温度以下，变性过程的自由能为正，逆反应（即折叠）为一自发过程。而在该温度以上时，ΔG_{denat}为负，蛋白趋于变性。

有一点很需要注意，就是 ΔG 为较大的负值并不意味着一个化学反应会以适当的速率进行。例如，ATP 使葡萄糖磷酸化生成 6-磷酸葡萄糖过程的自由能变化很大且为负，但当 ATP 和葡萄糖仅仅简单地混合在一起时该反应并不进行。只有己糖激酶加入后反应才进行。与此类似，大多数生物分子，包括蛋白质、核酸、糖和脂类在水解条件下都是热力学不稳定的，但它们的自发水解速率很低。只有在水解酶加入后反应才以合理的速率进行。虽然酶对于加速反应非常重要，它们并不改变反应的 ΔG。作为催化剂它们只能加快趋于热力学平衡的过程，却不能使 ΔG 为正的过程进行。

前面对基本热力学函数的定义仅适用于组成固定的系统。对于组成发生变化的系统，这些状态函数并不足以描述化学反应以及一开始时是分离的物质间的扩散过程中可能发生的变化。要修正这一缺陷，就要认识到 U，H，S 和 G 除了与固定组成系统中所用的两个本征热力学变量（如温度和压力）相关外，也是溶液中各种物质的总量的函数。因此，自由能可表示为：

$$G = G(T, p, n_1, n_2, \cdots, n_N) \tag{14.2}$$

其中 n_1，n_2，…，n_N 分别是物质 1 到 N 的总物质的量。由前述方程，得到：

$$\mathrm{d}G = -S\mathrm{d}T + V\mathrm{d}p + \sum \mu_i \mathrm{d}n_i \tag{14.3}$$

其中，

$$S = \left.\frac{\partial G}{\partial T}\right|_{p, n_i}; \quad V = \left.\frac{\partial G}{\partial p}\right|_{T, n_i}; \quad \mu_i = \left.\frac{\partial G}{\partial n_i}\right|_{T, p, n_{j \neq i}} \tag{14.4}$$

在前述方程中，μ_i 称为化学势或化合物 i 的吉布斯自由能。这一变量也由吉布斯引入以简化开放系统及组成变化的封闭系统的分析。它定义为在恒温恒压下加入无限小量的某种物质时系统自由能的增加量除以该物质的加入量。正如温度差决定了热流方向，压力差决定了物体运动方向一样，化学势的差异可以用来度量某一化学反应发生的趋势或某一物质沿化学

势减小方向扩散的趋势。在此意义上，化学势可以被看做是一种化学上的压力，它就像温度和压强一样是一种内部强度性质。

类似地，化学势也可以其它热力学状态函数如 U 和 H 的形式来定义，从而可得到：

$$dU = TdS - pdV + \sum \mu_i dn_i \tag{14.5}$$

$$dH = TdS + Vdp + \sum \mu_i dn_i \tag{14.6}$$

这里化学势可写作：

$$\mu_i = \left.\frac{\partial G}{\partial n_i}\right|_{T,p,n_{j\neq i}} = \left.\frac{\partial U}{\partial n_i}\right|_{S,V,n_{j\neq i}} = \left.\frac{\partial H}{\partial n_i}\right|_{S,p,n_{j\neq i}} \tag{14.7}$$

考虑到这些热力学状态函数定义的条件，可得到下式：

$$U = TS - pV + \sum \mu_i n_i \tag{14.8a}$$

$$H = TS + \sum \mu_i n_i \tag{14.8b}$$

$$G = \sum \mu_i n_i \tag{14.8c}$$

这些表达式，尤其是式（14.8c），对于确定化学反应自发性非常重要。

一化合物的吉布斯自由能与其浓度相关，其关系可通过众所周知的关于化学势的方程表示：

$$\mu_i = \mu_i^0(p, T) + RT\ln\left(\frac{f_i c_i}{f_{i,\mathrm{ref}} c_{i,\mathrm{ref}}}\right) \tag{14.9}$$

式中，f_i 是化合物 i 的活度系数；μ_i^0 是在一由活度系数 $f_{i,\mathrm{ref}}$ 及浓度 $c_{i,\mathrm{ref}}$ 表示的参考状态下化合物 i 的化学势。参考化学势是温度和压力的函数。一般参考状态定义为浓度 $c_{i,\mathrm{ref}} = 1\mathrm{mol \cdot L}$，活度系数 $f_{i,\mathrm{ref}} = 1$。此外，生物体系一般假定为稀溶液［这对很多（但不是所有的）胞内化合物是一个合理的假定］，这意味着 $f_i = 1$，由此式（14.9）简化为：

$$\mu_i = \mu_i^0(p, T) + RT\ln(c_i) \tag{14.10}$$

式中，c_i 是第 i 种化合物的摩尔浓度。

由化学反应（或任何种过程）中反应物和产物的化学势可以计算出该反应（或过程）的自由能变化。由此对下面的一般反应：

$$c\mathrm{C} + d\mathrm{D} - a\mathrm{A} - b\mathrm{B} = 0 \tag{14.11}$$

其自由能变化由式（14.8c）可得到为：

$$\Delta G = c\mu_\mathrm{C} + d\mu_\mathrm{D} - a\mu_\mathrm{A} - b\mu_\mathrm{B} \tag{14.12}$$

将式（14.9）代入式（14.2）中可得：

$$\Delta G = \Delta G^{0'} + RT\ln\left(\frac{c_\mathrm{C}^c c_\mathrm{D}^d}{c_\mathrm{A}^a c_\mathrm{B}^b}\right) \tag{14.13}$$

式中，$\Delta G^{0'}$ 是当反应物和产物均处于标准状态时（见方框 14.1）反应的自由能变化。因此，自由能变化包括两部分，一是仅决定于反应类型（及温度和压力）的常数项，一是决定于温度、反应物和产物浓度及化学计量系数的可变部分。对处于平衡的反应，自由能为零，式（14.13）变为：

$$\Delta G^{0'} = -RT\ln(K_\mathrm{eq}) \tag{14.14}$$

其中 K_eq 是反应的平衡常数：

$$K_\mathrm{eq} = \frac{c_{\mathrm{C,eq}}^c c_{\mathrm{D,eq}}^d}{c_{\mathrm{A,eq}}^a c_{\mathrm{B,eq}}^b} = e^{-\Delta G^{0'}/RT} \tag{14.15}$$

显而易见由式（14.15）可以由标准自由能数据计算出平衡常数，反之亦然。作为指数

相关的结果，即使非常小的负标准自由能变化也会导致平衡常数远大于1。平衡常数100对应的$\Delta G^{0\prime}$值仅-11.4kJ/mol。由式（14.13）可以看出，如果反应物浓度超过平衡浓度，净反应将正向进行直到多余的反应物都转化为产物并达到平衡。与之相似，如果产物浓度超过平衡浓度，净反应将逆向进行直到多余的产物都转化为反应物以达到平衡。因此，正如Le Chatelier原理所描述的，所有对平衡的偏离都会激发一个恢复平衡的过程，因此所有封闭系统一定都不可避免地要达到平衡。活细胞通过成为一开放系统挣脱了这一热力学约束。

方框 14.1　标准态规定

在物理化学中通常规定溶质的标准态为25℃和1atm（101325Pa）条件下的单位浓度（或活度）。由于生化反应通常在接近中性的pH值的稀水溶液中进行，所以稍微有点不同的标准态常被用于生物系统中。

● 水的标准态规定为纯液体的标准态。因此，尽管实际上水的浓度为55.5mol/L，水的浓度（或活度）取作1。

● 氢离子活度定义为1，其对应于有生理意义的pH值为7的条件，而不是pH值为零的化学标准态。

● 一个可经历酸-碱反应的化合物的标准态以pH值为7，其自然存在的离子混合物的 总浓度的形式来定义。优点是：通常，测量一个化合物的总浓度比测量其一个离子物质的浓度要更容易些。因此一种酸或碱的离子组成随pH而变化，然而用总浓度计算的标准自由能仅在pH值为7时才有效。

用上述参考态，标准自由能变化一般用符号$\Delta G^{0\prime}$来表示，这里加了撇号“′”以区别于正常状态的标准自由能的变化。由于自由能变化与参考态无关，所以参考态的选择没有关系。然而，在用公式表示水和原子对自由能变化的影响时，规定参考态是很重要的。因此，如果用生物标准态作参照，水的浓度可以从式（14.13）中省去。类似地，如果反应在pH值为7时进行，则质子浓度不必被包括。如果反应在pH值不等于7的情况下进行，质子浓度应当取与10^{-7}有关的值，即应当作为$[H^+]/10^{-7}$出现。

反应的标准自由能变化可以简单地通过反应物和产物的生成自由能计算出。在表14.1中列出了一些与生物化学有关的物质的生成自由能。此外，应用基团贡献法可以计算出一些没有测定过的物质的自由能（见14.2.2节）。对EMP途径中反应的$\Delta G^{0\prime}$值的检查（见例14.1）表明其中某些反应具有正值，另一些则为负。因为在一般条件下有一净通量通过该途径，其中的代谢物和辅因子浓度自动调节以使每一步反应的吉布斯自由能变化均为负（见例14.1）。因此，高水平的NAD^+/NADH比（这一比例由许多胞内反应所控制）保证了由3-磷酸甘油醛到3-磷酸甘油酸磷酸的反应是热力学可行的，即使该反应的$\Delta G^{0\prime}$值为6.28kJ/mol。此外，EMP途径中随后的反应的标准自由能变化为-18.83kJ/mol，这保证了该反应即使在3-磷酸甘油酸磷酸浓度很低时仍可自发进行并推动产生它的反应。因而，代谢途径中那些在热力学上并不倾向正向进行的反应可以在其它具有较大的负自由能变化的反应推动下进行。这是14.2节中热力学可行性分析的基础。

有一点很值得注意，就是在大多数代谢途径中第一步和最后一步反应往往具有较大的负吉布斯自由能，例如葡萄糖磷酸化生成葡萄糖-6-磷酸反应的$\Delta G^{0\prime}$为-16.7kJ/mol，丙酮酸生成乳酸的反应$\Delta G^{0\prime}$为-25.1kJ/mol。这保证了即使在底物浓度较低而产物浓度较高时这些反应在热力学上仍倾向于正向进行（丙酮酸到乳酸的转化因为高的NAD^+/NADH比而在

热力学上进一步强化)。

表 14.1 各种物质的标准生成自由能

化合物	$\Delta G_f^{0\prime}$/kJ·mol^{-1}	化合物	$\Delta G_f^{0\prime}$/kJ·mol^{-1}
乙醛	139.7	3-磷酸甘油醛	1285.6
乙酸	369.2	水	237.2
乙酰辅酶 A	374.1	异柠檬酸	1160.0
顺乌头碱	920.9	α-酮戊二酸	789.0
二氧化碳	386.2	乳酸	516.6
柠檬酸	1166.6	苹果酸	845.1
磷酸二羟丙酮	1293.2	羟基	157.3
乙醇	181.5	草酰乙酸	797.2
果糖	915.4	磷酸烯醇丙酮酸	1269.5
6-磷酸果糖	1758.3	2-磷酸甘油酸	1285.6
1,6-二磷酸果糖	2600.8	3-磷酸甘油酸	1515.7
延胡索酸	604.2	丙酮酸	474.5
葡萄糖	917.2	琥珀酸	690.2
6-磷酸葡萄糖	1760.2	琥珀酰辅酶 A	686.7①

① 该化合物由自由元素和自由辅酶 A 形成。

【例 14.1】 糖酵解反应的自由能变化

要确定细胞反应的自由能变化，必须要知道参与反应的所有代谢物及辅因子的浓度。这些数据仅对较少的代谢途径是可以得到的，因此热力学考虑常常基于对标准自由能变化的估计。然而这样有可能导致错误的结论，因为标准自由能变化假定某一固定的反应物和产物浓度（标准状态），这与实际胞内代谢物浓度不相符。而这一浓度差可能对实际的自由能变化产生很大影响。为了说明这一点，计算 EMP 途径中某些反应的自由能变化。表 14.2 列出了人体红细胞 MEP 途径中间代谢物、ATP、ADP 及正磷酸盐的浓度。表 14.3 列出了计算得到的自由能变化。

表 14.2 人体红细胞 EMP 途径中间代谢物和辅助因子的浓度

中间代谢物/辅助因子	浓度/μmol·L^{-1}	中间代谢物/辅助因子	浓度/μmol·L^{-1}
葡萄糖(GLU)	5000	2-磷酸甘油(2PG)	29.3
6-磷酸葡萄糖(G6P)	83	磷酸烯醇丙酮酸(PEP)	23
6-磷酸果糖(F6P)	14	丙酮酸(PYR)	51
1,6-二磷酸果糖(FDP)	31	ATP	1850
二羟基丙酮(DHAP)	138	ADP	138
3-磷酸甘油醛(GAP)	18.5	P_i	1000
3-磷酸甘油(3PG)	118		

注：数据取自 Lehninger (1975)。

从计算出的自由能变化可以看到除了己糖激酶、磷酸果糖激酶、丙酮酸激酶及可能还有三糖异构酶催化的反应外，其它 EMP 途径中的反应都接近平衡（3-磷酸甘油醛脱氢酶和 3-磷酸甘油酸激酶催化的系列反应的自由能变化也接近于零）。因此许多酶的胞内活性都足够高以使这些反应达到平衡，换句话说，这些转化的正反应和逆反应都远比通过该途径的通量快很多。显而易见，这些接近平衡态的反应对中间代谢物的浓度变化非常敏感，也就是说它们具有较大的弹性系数。因此它们可以迅速的对途径中其余具有较大的负自由能变化的反应

表 14.3 人体红细胞 EMP 途径中反应的自由能变化

反　应	$\Delta G^0/\mathrm{kJ\cdot mol^{-1}}$	ΔG(表达式)	$\Delta G/\mathrm{kJ\cdot mol^{-1}}$
己糖激酶	−16.74	$\Delta G^{0\prime}+RT\ln\frac{[G6P][ADP]^-}{[GLC][ATP]}$	−33.3
6-磷酸葡萄糖异构酶	1.67	$\Delta G^{0\prime}+RT\ln\frac{[F6P]}{[G6P]}$	−2.7
磷酸果糖激酶	−14.22	$\Delta G^{0\prime}+RT\ln\frac{[FDP][ADP]}{[F6P][ATP]}$	−18.7
醛缩酶	23.97	$\Delta G^{0\prime}+RT\ln\frac{[DHAP][GAP]}{[FDP]}$	0.7
磷酸丙糖异构酶	7.66	$\Delta G^{0\prime}+RT\ln\frac{[GAP]}{[DHAP]}$	2.7
磷酸甘油酸变位酶	4.44	$\Delta G^{0\prime}+RT\ln\frac{[2PG]}{[3PG]}$	1.0
烯醇化酶	1.84	$\Delta G^{0\prime}+RT\ln\frac{[PEP]}{[2PG]}$	1.2
丙酮酸激酶	−31.38	$\Delta G^{0\prime}+RT\ln\frac{[PYR][ATP]}{[PEP][ADP]}$	−23.0

形成的通量变化做出反应。

三个具有较大的负自由能变化的反应是热力学不可逆的并且常被看做是代谢途径中的关键控制步骤（参见第 5 章中关于平衡态酶的讨论)。显然己糖激酶、磷酸果糖激酶和丙酮酸激酶的胞内活性都很低以至于不足以平衡其催化的反应。这可能是基因表达太低的结果，即酶的胞内 v_{max}太低，或者是酶活性调控的结果，如别构调控或共价酶修饰。例如磷酸果糖激酶的别构调控，这已经在 2.3.1 节中作了深入阐述。

14.2 热力学可行性

如前面一节所述，ΔG 为负时化学反应或运输过程是可行的。进一步说，要使一个生物化学反应和运输过程可行，所有相关步骤就都要满足上述规则。即所有相关反应的 ΔG 都必须为负。如果途径中至少有一个反应的 ΔG 大于零，则这个途径就是不可行的。如果只有一个反应步骤是不可行的，把它称为局部热力学瓶颈，反之，如果几个反应都违反了 $\Delta G<0$的标准，则称之为分布式热力学瓶颈。

现在考虑下面的两反应序列：

$$A\rightarrow B\rightarrow C \tag{14.16}$$

在下面的不等式同时满足时，这两个反应将从左至右进行：

$$\Delta G_1=\Delta G_1^{0\prime}+RT\ln\frac{c_B}{c_A}<0 \tag{14.17}$$

$$\Delta G_2=\Delta G_2^{0\prime}+RT\ln\frac{c_C}{c_B}<0 \tag{14.18}$$

如果两个反应的 $\Delta G^{0\prime}$都小于零，那么前述反应系统就可由左向右进行并且代谢物 A，B，C 的浓度可以非常平坦地变化。然而，当 $\Delta G_1^{0\prime}$小于零而 $\Delta G_2^{0\prime}$大于零时，代谢物 B，C 就要有一个大的浓度梯度以克服第二个反应的正的标准自由能变化。这些用图表表示在图 14.1 中，其中也列出了 $\Delta G_1^{0\prime}>0$ 而 $\Delta G_2^{0\prime}<0$ 及二者均大于零的情况。在后者情况下，反应

物浓度 c_A 和最终产物浓度 c_C 之间需要有很大的浓度梯度才能克服两个反应的正 $\Delta G^{0\prime}$ 值。显然正 $\Delta G^{0\prime}$ 值可以通过代谢物浓度差来克服，但只能是在一定程度上。

当前述系统推广到包括更多反应的反应序列时，很显然为了克服多个反应的正 $\Delta G^{0\prime}$ 值最终代谢物浓度就要非常低，这有可能会低于生理条件许可的浓度范围。考虑到代谢物可同时参与许多反应进而对其浓度产生不同的限定，可以看到它们的浓度成为决定反应可行性并进而决定整个网络的可行性的决定因素。显然需要一个系统的方法来确定在何种程度上在一个允许的代谢物浓度范围内使所有的热力学约束都可被满足，由此确定一个代谢网络的热力学可行性（Mavrovouniotis，1993）。在后面将介绍这样一种方法，其中通过对一些原始变量的简单变换来简化分析过程。

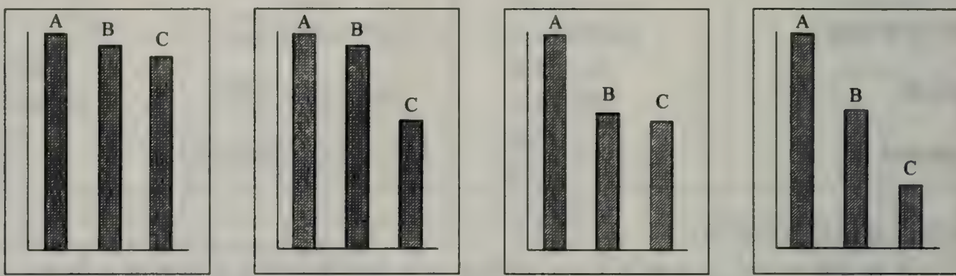


图 14.1　使系统［如式（14.16）］中的反应在热力学上可行所需的浓度梯度

14.2.1　算法

现在考虑具有如下化学计量关系的一组反应：

$$\sum_{i=1}^{K} g_{ji} X_i = 0;\ j = 1, \cdots, J \tag{14.19}$$

对每步反应其吉布斯自由能变化可写为：

$$\Delta G_j = \Delta G_j^{0\prime} + \sum_{i=1}^{K} g_{ji} RT \ln c_i;\ j = 1, \cdots, J \tag{14.20}$$

式中，c_i 是反应（14.19）中代谢物 X_i 的浓度。进一步假定某些代谢物浓度恒定，而其它的可以在一定范围内变化。一般地，ATP、NADH 及其它辅因子［称做流通代谢物(currency metabolites)］的浓度常被限定在一很小的范围内，因此可以假定实际上是恒定的。由这一组代谢物，可以重写式（14.20）为：

$$\Delta G_i = \Delta G_i^{0\prime} + \sum_{\text{流通代谢物}} g_{ji} RT \ln c_i + \sum_{i=1}^{K'} g_{ji} RT \ln c_i \tag{14.21}$$

式中，K' 表示浓度允许在一定范围内变化的代谢物数目。若式中前两项合并在一起并写为 $\Delta G^{0\prime\prime}$，则式（14.21）可化为：

$$\Delta G_i = \Delta G_i^{0\prime\prime} + \sum_{i=1}^{K'} g_{ji} RT \ln c_i \tag{14.22}$$

则使得代谢途径热力学可行的要求可由以下不等式表述：

$$\frac{\Delta G_j^{0\prime\prime}}{RT} + \sum_{i=1}^{K'} g_{ji} \ln c_i < 0;\ j = 1, \cdots, J \tag{14.23}$$

为方便起见，可以将每一代谢物浓度针对其允许变化的范围进行归一化。这可通过以下步骤完成，首先重写式（14.23）为式（14.24）：

$$\frac{\Delta G_j^{0''}}{RT}+\sum_{i=1}^{K'}g_{ji}\ln c_i^{\min}+\sum_{i=1}^{K'}g_{ji}\ln\frac{c_i}{c_i^{\min}}<0 \tag{14.24}$$

或

$$\frac{\Delta G_j^{0''}}{RT}+\sum_{i=1}^{K'}g_{ji}\ln c_i^{\min}+\sum_{i=1}^{K'}g_{ji}\ln\frac{c_i^{\max}}{c_i^{\min}}\times\frac{\ln\frac{c_i}{c_i^{\min}}}{\ln\frac{c_i^{\max}}{c_i^{\min}}}<0 \tag{14.25}$$

随后基于在允许浓度变化范围内实际代谢物浓度的相对值可定义一无因次浓度 f_i。由此设：

$$h_j=\frac{\Delta G_j^{0''}}{RT}+\sum_{i=1}^{K'}g_{ji}\ln c_i^{\min};\ j=1,\cdots,J \tag{14.26}$$

$$w_{ji}=g_{ji}\ln\frac{c_i^{\max}}{c_i^{\min}};\quad j=1,\ \cdots,\ J \tag{14.27}$$

$$f_i=\frac{\ln\frac{c_i}{c_i^{\min}}}{\ln\frac{c_i^{\max}}{c_i^{\min}}} \tag{14.28}$$

式（14.25）即可写为：

$$H_j=h_j+\sum_{i=1}^{K'}w_{ji}f_i<0;\ j=1,\ \cdots,\ J \tag{14.29}$$

一个新的热力学/计量学意义可以赋予前述各变量。例如，h_j 可以解释为在每个代谢物均处于最低允许浓度而不是事先确定的 $1\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$的浓度时（其是吉布斯自由能等于 $\Delta G^{0'}$时的状态）的自由能变化。与之类似，w_{ji}是一新定义的化学计量系数，它保留了 g_{ji}的符号。此外，从 w_{ji}来说反应仍具有加和性，它们可以与应用 g_{ij}时相同的方式进行组合。最后，f_i 是归一化的浓度，它使得可以以线性的形式确定可行性规则，这将大大简化计算过程。

在上述转换的框架内，热力学可行性的问题被简化为确定一组归一化的代谢物浓度 f_i 以使得所有的不等式 $H_j<0$ 同时满足。如果没有解可以满足这些约束，式（14.19）确定的反应组就是热力学不可行的。由于归一化的浓度 f_i 介于 0 和 1 之间，这样可以对 H_j 引入两组值，即最大值和最小值。在反应物（具有负的计量系数，$w_{ji}<0$）浓度最小（对应于 $f_i=0$）而产物（具有正的计量系数，$w_{ji}>0$）浓度最大（对应于 $f_i=1$）时可得到最大值。在这一条件下，反应的热力学推动力显然是最小的。因此可得：

$$H_{j,\max}=h_j+\sum_{i=1}^{K'}w_{ji};\ \ w_{ji}>0 \tag{14.30}$$

类似地，可得到 H_j 的最小值如下：

$$H_{j,\min}=h_j+\sum_{i=1}^{K'}w_{ji};\ \ w_{ji}<0 \tag{14.31}$$

从前述变量可以看出 $H_{j,\min}$代表了当所有代谢物均处于热力学最有利的浓度时的归一化吉布斯自由能。这一新的归一化使得 $H_{j,\min}$可以解释为使反应离开平衡态最有利的距离。因此，$H_{j,\min}<0$ 是反应 j 在热力学上可行的必要条件，从而 $H_{j,\min}>0$ 是反应 j 热力学上不可行的充分条件。相似地，$H_{j,\max}$则代表了反应离开平衡最不利的距离。因此，$H_{j,\max}<0$ 是反应 j 在热力学上可行的充分条件，$H_{j,\max}>0$ 是反应 j 在热力学上不可行的必要条件。此外，还可看出热力学可行反应的线性组合也产生一个热力学可行的反应，而热力学不可行反

应的线性组合形成一个热力学不可行反应。因此，如果 $H_{j,max}<0$，反应 j 就可在一组热力学上不可行的反应中被排除。

前述转化反应的线性特性提供了一些其它的优点。如果反应 j 是两个其它反应 1 和反应 2 的线性组合，那么对复合反应的归一化吉布斯参数 h_j 就同样是吉布斯参数 h_1 和 h_2 的线性组合。类似地，H_j 也同样是 H_1、H_2 的线性组合。若假定两个组成反应没有共同的代谢物则对 H_{max} 和 H_{min} 也可得出类似的式子。在这种情况下，即当一个代谢物是一个反应的产物而又是另一个反应的反应物时，可以表明：复合反应的 H_{min} 比各组成反应的线性组合要大，而 H_{max} 比各组成反应的线性组合要小。

在通过某一算法检验代谢途径的热力学可行性时，应该检查 $H_{j,min}$ 和 $H_{j,max}$ 的符号：

- 如果 $H_{j,min}>0$，反应 j 在热力学上总是不可行的。
- 如果 $H_{j,min}<0$ 并且 $H_{j,max}>0$，对反应 j 的可行性或不可行性无法给出结论。在这种情况下，反应 j 应该和一个具有共同代谢物的反应结合起来并重新计算所产生的复合反应的 H_{max} 和 H_{min} 以评估其可行性。正如前面提到的，因为复合反应比其组成反应有更高的 H_{min} 和更低的 H_{max}，反应的不断组合会最终得出热力学可行性或不可行性的明确判断。
- 如果 $H_{j,max}<0$，反应 j 总是可行的。

上述思路可以通过一个简单的算法来实现以检验生化途径的热力学可行性（见方框 14.2）。

方框 14.2　确定热力学可行性的算法

Mavrovounitis（1993）提出了一个算法，其所依据的可行性转换判据已在上述正文中进行了叙述。该算法有如下几个步骤。

（1）假定每个代谢物浓度的上限和下限。

（2）识别流通代谢物（假设浓度恒定）。

（3）依次计算 $\Delta G_j^{0''}$，$\Delta G^{0''}/RT$，h_j，w_{ji}，$H_{j,min}$ 和 $H_{j,max}$。

（4）从瓶颈反应组中排除 $H_{j,max}<0$ 的所有反应。对于所规定的代谢物浓度范围，这些反应总是可行的。

（5）保留 $H_{j,min}>0$ 的所有反应。对于所规定的代谢物浓度范围，这些反应总是不可行的。

（6）对于保留下的反应，构成两个反应的组合以使得一个中间代谢物总是被清除。在没有这样的中间代谢物存在的情况下，反应就不能被进一步组合，而且不可能是不可行的，则结束搜寻。否则返到步骤（3）。

热力学瓶颈从步骤（6）被识别出。重要的是要强调：瓶颈仅仅是对规定的代谢物浓度范围而存在的。如果已经知道通过途径的流，该算法也能用于确定很可能的体内代谢物浓度的范围。

【例 14.2】　EMP 途径的热力学可行性分析

在本例中，通过 EMP 途径来说明热力学可行性分析的算法，该途径也在例 14.1 中讨论过。这个例子是基于 Mavrovouniotis（1993）的工作，他首先提出了上述算法。EMP 途径图示于图 2.6 中。本例中所用代谢物的缩写在表 14.2 给出，而表 14.3 则给出了酶的名称

和途径中各酶反应的标准吉布斯自由能变化。正如在例 14.1 中已经讨论过的，由于多个反应有正的标准吉布斯自由能， 反应和途径的可行性不能直接由 $\Delta G^{0\prime}$的值来判定，但众所周知这是一个可行的途径。假定 pH 值为 7，因此水、H^+ 和 OH^- 浓度均处于其标准状态，这意味着它们可以在计算中忽略。对能量流通代谢物 ADP、ATP 和 P_i 假定其浓度不变。这个假定是与大量的试验观测是一致的，这些观察认为全局控制把这些代谢物的浓度维持在一个预先确定的很窄的范围内。还可进一步假定所有活度系数恒等于 1。本例中的流通代谢物浓度使用如下值：[AMP] = 0.82mmol·L^{-1}，[ADP] = 1.04mmol·L^{-1}，[ATP] = 7.9mmol·L^{-1}，以及[P_i] = 7.9mmol·L^{-1}，这相当于 0.87 的能荷。此外，[NAD^+] = 4mmol·L^{-1}，[NADH] = 0.2mmol·L^{-1}，这和 0.05 的异化代谢还原负荷（catabolic reduction charge）相符。下面，将研究 EMP 途径中其它代谢物的允许浓度范围的几个不同的可能性。

首先，检查 0.1～1.0mmol·L^{-1}的浓度范围。表 14.4 列出了在该算法中所概述的 10 个反应步骤的计算结果。基于计算的 H_{min}和 H_{max}的符号，能够判断出反应 1、3、7 和 10 总是可行的，而反应 5 和反应 6 则被确定为两个局部瓶颈。对反应 2、4、8 和反应 9 由 H_{min} 和 H_{max}的计算结果不能得出结论。因为反应 1 和反应 3 在所考察的浓度范围内总是可行的，它们本身不是局部瓶颈，而且它们也绝不可能是分布式瓶颈的一部分。反应 2 和反应 4 与反应 1 或者反应 3 组合在一起也不可能是分布式瓶颈的一部分，因此可以从瓶颈反应列表中排除。对于反应 5 和反应 6，它们都是局部瓶颈，而且在考察的浓度范围内对所有浓度值都是不可行的。

表 14.4　第一间隔（0.1～1.0mmol·L^{-1}）各个反应参数的计算结果

序号	$\Delta G_j^{0\prime}$/kJ·mol^{-1}	$\Delta G_j^{0\prime}/RT$	$\Delta G_j^{0\prime\prime}/RT$	h_j	H_{min}	H_{max}
1	-16.74	-6.753	-8.781	-8.781	-11.083	-6.478
2	1.67	0.675	0.675	0.675	-1.627	2.978
3	-14.22	-5.740	-7.768	-7.768	-10.070	-5.465
4	23.97	9.674	9.674	0.464	-1.839	5.069
5	7.66	3.090	3.090	3.090	0.787	5.392
6	6.28	2.532	12.895	3.867	1.564	7.017
7	-18.83	-7.597	-5.570	-5.570	-7.872	-3.267
8	4.44	1.790	1.790	1.790	-0.513	4.092
9	1.84	0.743	0.743	0.743	-1.560	3.045
10	-31.38	-12.662	-10.635	-10.635	-12.937	-8.332

注：只有最后三列的估算基于 c_{min}和 c_{max}。在反应中代号表示：1—己糖激酶；2—6-磷酸葡萄糖异构酶；3—磷酸果糖激酶；4—醛缩酶；5—6-磷酸丙糖异构酶；6—3-磷酸甘油醛脱氢酶；7—3-磷酸甘油激酶；8—3-磷酸甘油变位酶；9—烯醇酶；10—丙酮酸激酶。

对反应 8 和反应 9 需要进一步检验。为此构造了所有两反应组合的子途径以消除一个中间代谢物。只有一个这样的组合是可能的，即反应 8 加上反应 9，其导致了 2-磷酸甘油酸的消除。下一步迭代对反应 8 和反应 9 的组合计算了归一化吉布斯参数 h，其值为 2.533，因此 H_{min}(8+9) 等于 0.23>0。由此可见，反应 8 和反应 9 的组合是分布瓶颈。分别考虑时反应 8 和反应 9 都是可行的，即对每一个反应在允许浓度范围内都有一个区域，可以使每个反应产生负吉布斯自由能，从而在热力学上可行。然而因为使它们可行的浓度范围没有重叠，使得两个反应的组合在热力学上却是不可行的。因此，在假定的代谢物浓度范围内得到的最后结果是反应 5 和反应 6 是局部瓶颈，而反应 8 和反应 9 的组合构成分布瓶颈。应该注意的是反应 4 具有最大的正标准吉布斯自由能，实际上却根本不是瓶颈反应。这很清楚地说

明仅仅根据标准吉布斯自由能不可能得出任何结论，正如在例 14.1 中已讨论的。

现在考察其它三个浓度范围：

- $c_{min}=0.1mmol\cdot L^{-1}$和 $c_{max}=2mmol\cdot L^{-1}$
- $c_{min}=0.02mmol\cdot L^{-1}$和 $c_{max}=4mmol\cdot L^{-1}$
- $c_{min}=0.004mmol\cdot L^{-1}$和 $c_{max}=5mmol\cdot L^{-1}$

在这些浓度范围应用上述算法计算的结果在表 14.5 中给出。对考察的第一个浓度范围，上限是以前值的 2 倍，也就是 $2mmol\cdot L^{-1}$代替了 $1mmol\cdot L^{-1}$。和以前分析的惟一不同在于当计算反应 8 和反应 9 的组合的归一化吉布斯参数 h 时，结果是 2.533，并且 $H_{min}(8+9)=-0.463<0$。因此，和前面的情况相反，反应 8 和 9 构成的子途径不能被确定为瓶颈，但它们也不能被否定，因为 $H_{max}(8+9)=5.529>0$。由于反应 8 和 9 不能和与它们共享同一代谢物的其它反应进一步组合，所以算法执行到这一步就结束了，其最后结果得到两个局部瓶颈，即反应 5 和反应 6。第二种情况中，代谢物浓度的上限和下限都被放宽。通过观察表 14.5 的结果，可以看出，不再有单个反应的 H_{min}大于零。因此，在第一步迭代计算中没有发现局部瓶颈。反应 2、4、5、6、8 和反应 9 仍可能是分布瓶颈，反应组合 8+9，4+5，4+6和反应组合 5+6 可以消除某一中间代谢物。对这些可能性，可以计算得到：

$$h_8+h_9=2.533,\ H_{min}(8+9)=-2.765<0,\ H_{max}(8+9)=7.831>0$$

$$h_4+h_5=1.944,\ H_{min}(4+5)=-3.354<0,\ H_{max}(4+5)=12.54>0$$

$$h_4+h_6=2.721,\ H_{min}(4+6)=-2.577<0,\ H_{max}(4+6)=14.164>0$$

$$h_5+h_6=6.957, H_{min}(5+6)=1.659>0$$

由此可见，反应 5 和反应 6 的组合是分布瓶颈，而反应组合 8+9，4+5 和反应组合 4+6 还要进一步检验。然而，由于反应组合 8+9 和反应组合 4+5 不能生成新的组合，它们被排除了。可以推断通过加大浓度范围可使反应 5 和反应 6 不再为局部瓶颈，而其组合成为分布瓶颈。如果浓度范围进一步扩大，就会出现更多分布瓶颈的可能性。反应 2、4、5、6、7、8 和反应 9 可以与前面相似的方式进行组合。然而第二步迭代计算并不充分，因为反应组合 5+6 和反应组合 4+6 及其它反应组合一样，仍然是候选瓶颈。这需要进行第三步迭代计算，计算三反应组合 4、5 和 2 倍的反应 6 并发现它是分布瓶颈，其值为：

$$h_4+h_5+2h_6=8.069,\ H_{min}=0.938>0$$

表 14.5 正文中所给三种浓度下各个反应参数的估算

序号	$c_{min}=0.1mmol\cdot L^{-1}$ $c_{max}=2mmol\cdot L^{-1}$			$c_{min}=0.02mmol\cdot L^{-1}$ $c_{max}=4mmol\cdot L^{-1}$			$c_{min}=0.004mmol\cdot L^{-1}$ $c_{max}=5mmol\cdot L^{-1}$		
	h_j	H_{min}	H_{max}	h_j	H_{min}	H_{max}	h_j	H_{min}	H_{max}
1	-8.781	-11.77	-5.785	-8.781	-14.08	-3.483	-8.781	-15.91	-1.650
2	0.675	-2.320	3.671	0.675	-4.623	5.974	0.675	-6.456	7.806
3	-7.768	-10.76	-4.772	-7.768	-13.07	-2.470	-7.768	-14.90	-0.637
4	0.464	-2.532	6.455	-1.146	-6.444	9.451	-2.755	-9.886	11.51
5	3.090	0.094	6.082	3.090	-2.209	8.388	3.090	-4.041	10.22
6	3.867	0.871	7.710	3.867	-1.432	10.01	3.867	-3.264	11.85
7	-5.570	-8.565	-2.574	-5.570	-10.87	-0.271	-5.570	-12.70	1.561
8	1.790	-1.206		1.790	-3.509	7.088	1.790	-5.341	8.921
9	0.743	-2.253		0.743	-4.555	6.041	0.743	-6.388	7.874
10	-10.64	-13.63	-7.639	-10.64	-15.93	-5.336	-10.64	-17.77	0.508

若要使所有分布瓶颈都被排除，计算出下限为 $0.0025\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$（上限为 $5\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$）。这种情况下可以发现前面反应 4、5 和 2 倍的反应 6 的组合的 $H_{\min}$是 $-0.003<0$。这表明，这些反应的复合转化（composite transformation）作为一个整体在热力学上是很困难的，其复合转化对应于以下方程

$$-\underset{(2,6\text{-二磷酸果糖})}{\text{fructose-2,6-bisphosphate}} - 2\text{NAD}^+ - 2\text{P}_i + 2\ \underset{(3\text{-磷酸甘油酸磷酸})}{\text{3-phosphoglycerol phosphate}} + 2\text{NADH}$$

为发生这种反应，需要假定 2,6-二磷酸果糖为最大可能浓度，而 3-磷酸甘油酸磷酸为最小可能浓度。而且，NADH 和 NAD^+间的比率至关重要。如果比率太高，热力学上就会在应确定的位置关闭该途径。

14.2.2 利用基团贡献法确定 $\Delta G^{0\prime}$

前面章节已经表明了反应的标准吉布斯自由能 $\Delta G^{0\prime}$在反应的热力学可行性判定上的重要性。少数反应的 $\Delta G^{0\prime}$是可以得到的（见表 14.1），但大多数反应没有标准吉布斯自由能的实验数据（或平衡常数）。在这种情况下，$\Delta G^{0\prime}$能通过相应反应的反应物和产物的标准化学势 $\mu_i^0(p,T)$或标准生成吉布斯自由能 $\Delta G_{f,i}^{0\prime}$ 计算得到，此时要将式（14.12）中的化学势用以下变量代替：

$$\Delta G^{0\prime} = \sum g_i \Delta G_{f,i}^0 \tag{14.32}$$

现在出现了一个难题，就是对不同的生化物质标准生成吉布斯自由能事先并不知道。因此需要有一种方法来从现有的实验数据中计算标准生成自由能。值得注意的是，一旦确定了这些参数，就可以用以计算有相应代谢物参与的其它生化反应的 $\Delta G^{0\prime}$。

有一种方法广泛应用于标准吉布斯自由能的估计，同时也应用于其它热力学特性的估计，即基团贡献法。为了计算一特定化合物的特性，可以将该物质分解为几个基团，将这些基团的贡献相加以得到该化合物的特性值。如果某个功能基团在一化合物结构中多次出现，那么它的贡献就要乘以其出现次数。在某些情况下，还需要进行其它处理以修正某些化合物的特殊结构特征。时常地，这些组成基团的贡献值还要加上一个原点值，它是用于估计某一结构特性的出发值并对所有具有该结构的化合物都是一恒定值。上述分析可以用式（14.33）来表示，该式表明了某一化合物的标准生成自由能就是原点值 P_0 与所有功能基团贡献值的加和。在式（14.33）中，P_j 表示了基团 j 的贡献，n_j 表示了在化合物中基团 j 的出现次数。

$$\Delta G^{0\prime} = P_0 + \sum_j n_j P_j \tag{14.33}$$

如式（14.33）所示，一旦知道各基团的贡献值就可计算出 $\Delta G^{0\prime}$的值。为了得到不同基团的贡献值，可以由大量化合物的实验测定的 $\Delta G^{0\prime}$的值拟合未知的 P_j 的值。因为每个基团对 $\Delta G^{0\prime}$的贡献都假定为线性的，上述过程可以直接通过线性回归实现，已有现成的数值算法可以使用。但是在多元线性回归计算中使用的数据必须慎重选择。第一，它们必须与所研究的生化过程中涉及的化合物相关。第二，它们必须来源广泛以使系统误差最小。第三，它们必须被筛选出来以确保它们能代表化合物分子结构中所有可能功能基团的贡献。最后，还要针对基团之间的相互作用进行修正，例如氮和与其相邻的羰基基团之间的相互作用。在决定要表示出的基团的确切类型时，要尽可能包含尽量多的相应基团以使其能表示所有可能生化组分对所考虑的性质的影响。当然这种基团的分解是有一定限度的，因为某些基团根本就

不能分解，而另外一些基团仍可分解但却会导致大的误差。在这种情况下，最小的化合物将被表示为只含有一个特殊基团。

在生物转化中，某些具有重要代谢功能的复杂生物化合物组常常一起同时出现，例如，一些辅因子对如 NAD^+/NADH 或 ATP/ADP。在这种情况下，这些因子对常用一个单个基团来表示 NAD^+/NADH 或 ATP/ADP 之间的转化。将这些因子对作为一个基团表示，就使得确定相应化合物标准生成自由能的复杂计算过程只需进行一次，而二者的差异在计算该基团参与的反应的 ΔG^0 时被包含在一个单个基团中。用这种办法使计算过程大大简化，而由相应化合物复杂结构导致的误差也被最小化了。在发展及应用基团贡献法时，所有化合物都被假定为处于水溶液中的通常状态。因此，氨基常常附带一个质子（$R\text{-}NH_3^+$ 而不是 $R\text{-}NH_2$），羧酸常常处于负离子状态（$R\text{-}CO\text{-}O^-$ 而不是 R-CO-OH），氨基酸则常处于两性离子状态等。

由大量相关生化物质，已确定出各种基团的贡献值。由 Mavrovouniotis（1990，1991）的工作所确定出的值列于表 14.6～表 14.12 中。从这些表中，本部分中讨论到的大部分内容都已采用了。此外，由于对许多生化物质其分解为基团及进行各种修正非常繁琐，大量环状化合物的吉布斯生成自由能已被预先计算出来并列于表 14.13 中。这些值可以直接用于计算相关物质参与的化学反应的吉布斯自由能 $\Delta G^{0\prime}$ 变化。

表 14.6　具有一个单键基团的贡献

基　团	贡献/kJ·mol⁻¹	基　团	贡献/kJ·mol⁻¹
$—CH_3$	35.6	—SH	58.6
$—NH_2$	46.0	$—COO^-$	-298.7
—OH(连接在苯环上)	-130.5	$—PO_3^{2-}$	42.7
—OH(主要的)	-119.7	$—SO_3^-$	-439.7
—OH(其次的)	-131.4	$—CO—OPO_3^{2-}$	-301.7
—OH(第三的)	-125.1	$—OPO_3^{2-}$(主要的)	-120.5
$—NH_3^+$	20.1	$—OPO_3^{2-}$(其次的)	-123.0
—CH═O	-72.4	$—OPO_3^{2-}$(第三的)	-104.2

表 14.7　具有两键或多键基团（不在同一个环上）的贡献

开 链 基 团	贡献/kJ·mol⁻¹	开 链 基 团	贡献/kJ·mol⁻¹
≡C—	100.4	$—NH^+<$	33.5
≡N	64.9	$—CH_2—$	7.1
≡CH	151.9	>CO	-114.2
═C<	18.4	$—O—PO_2—$	-21.8
—CH═	46.0	—S—S—	24.7
$═CH_2$	79.5	$—CO—O^-$	-307.9
$—NH_2^+$	3.3	—S—	39.7
═NH	59.8	$>NH_2^+$	28.9
>C<	-58.6	—O—(基团$—O—PO_2—$中的—O—)	-102.9
—CH<	-22.6	—O—	-94.1
>N—	24.3	—NH—	32.6

表 14.8 同一个环上基团的贡献

环上基团	贡献/kJ·mol⁻¹	环上基团	贡献/kJ·mol⁻¹
$>N^+=$（在非芳香环上为单键或双键）	-0.4	—CH=	40.2
>C—（苯环上）	4.6	—N<	31.0
>C=（在非苯环上是两个单键）	95.4	—CH<	-10.8
>C=（在非苯环上为单键或双键）	33.1	—O—CO—	-227.2
>C<	-57.3	—CO—	-114.6
=N—	43.9	—O—	-100.8
>CH（苯环上）	36.0	—NH—	41.4
		—CH—	26.4
		—O—PO_2^{1-}—	65.3

注：如非特别注明，这些化合物参加的是非芳香环反应。

表 14.9 在两个相连环上的基团贡献

具有两环的基团	贡献/kJ·mol⁻¹	具有两环的基团	贡献/kJ·mol⁻¹
>C—（在两个相连的苯环上）	9.6	—CH<（在两个相连的非苯环上）	-5.4
—N<（在两个相连的非苯环上）	79.9	>C=（在两个相连的非苯环上）	70.7

表 14.10 溶液中吉布斯能的初始和附加的校正

校　正	贡献/kJ·mol⁻¹	校　正	贡献/kJ·mol⁻¹
初始值	-103.3	每个三碳环	123.4
碳氢化合物分子（只含C、H元素）	16.7	每个氨基化合物（N连于羰基上）	-43.9
每个苯环	-25.1	每个芳香杂环（含N、S和O元素）	-24.7

注：许多环状化合物的吉布斯的能已经预先计算好了（见表 14.13）。

表 14.11 未分解成基团的小化合物的吉布斯能值

分子式	名　称	吉布斯能值/kJ·mol⁻¹	分子式	名　称	吉布斯能值/kJ·mol⁻¹
$^-OCO—COO^-$	草酸根	-668.6	SO_3^{2-}	亚硫酸根	-495.4
CH_4	甲烷	-34.3	NO_3^-	硝酸根	-115.1
$HCOO^-$	甲酸根	-355.2	NO_2^-	亚硝酸根	-29.3
$CH_2=O$	甲醛	-151.0	NH_4^+	铵根	-75.7
H_2CO_3	碳酸	-623.0	H_2O	水	-236.8
HCO_3^-	碳酸根	-586.6	OH^-	氢氧根	-197.1
$HP_2O_7^{3-}$	焦磷酸根	-240.2	H^+	氢离子	-39.7
HPO_4^{2-}	磷酸根	-249.4			

表 14.12 特别化合物对的吉布斯能差

基　团	吉布斯能值差/kJ·mol⁻¹	基　团	吉布斯能值差/kJ·mol⁻¹
NADH(还原态)-NAD⁺(氧化态)	19.8	取代辅酶 A-SH-辅酶 A（为计算吉布斯能差，必须修正取代基团的贡献）	-55.2
NADPH(还原态)-NADP⁺(氧化态)	19.8	还原态（Pyocyamine）-氧化态（Pyocyamine）	-74.5

表 14.13　一些环状化合物的标准生成吉布斯自由能的估计值

化　合　物	标准生成吉布斯自由能/$kJ \cdot mol^{-1}$	化　合　物	标准生成吉布斯自由能/$kJ \cdot mol^{-1}$
辅酶 A 的衍生物(相对吉布斯能值)①		2′-脱氧胸苷二磷酸(dTDP)	−637.2
乙酰辅酶 A	−138.5	次黄苷二磷酸(IDP)	−471.1
草酰辅酶 A	−472.8	胸苷二磷酸(TDP)	−805.4
丙烯辅酶 A	−48.5	腺苷二磷酸(ADP)	−230.5
丙酰辅酶 A	−131.4	鸟苷二磷酸(GDP)	−431.8
丙二酰辅酶 A	−465.7	尿苷三磷酸(UTP)	−856.0
丁烯酰辅酶 A	−46.0	胞啶三磷酸(CTP)	−615.9
乙酰乙酰辅酶 A	−245.2	次黄苷三磷酸(ITP)	−492.9
丁酰酮辅酶 A	−245.2	胸苷三磷酸(TTP)	−827.6
丁酰辅酶 A	−124.3	腺苷三磷酸(ATP)	−252.7
甲基丙二酰辅酶 A	459.4	鸟苷三磷酸(GTP)	−453.5
琥珀酰辅酶 A	−458.6	核苷和核苷酸的衍生物	
丙氨酰辅酶 A	−139.7	UDP-葡糖醛酸	−1685.7
3-羟基丁酰辅酶 A	−284.9	UDP-葡萄糖	−1499.5
酮己酰辅酶 A	−231.0	CDP-葡萄糖	−1259.4
己酰辅酶 A	−110.0	GDP-半乳糖	−1097.5
3-羟基己酰 COA	−270.7	GDP-葡萄糖	−1097.5
羟基丁烯酰辅酶 A	−299.6	GDP-甘露糖	−1097.5
棕榈酰辅酶 A	−38.5	腺苷巯基丁氨酸	−335.1
核苷和碱		腺嘌呤琥珀酸	−835.1
尿嘧啶	−282.0	腺苷酰-α-氨基己二酸	−697.9
4,5-二氢尿嘧啶	−284.9	四氢叶酸和其衍生物	
次黄嘌呤	81.2	7,8-二氢叶酸	−310.0
次黄(嘌呤核)苷	81.2	四氢叶酸	−356.5
胸腺嘧啶	−253.6	N^5,N^{10}-次甲基四氢叶酸	−286.6
腺嘌呤	321.3	N^5,N^{10}-亚甲基四氢叶酸	−268.6
黄嘌呤	−120.1	N^{10}-甲酸四氢叶酸	−480.3
鸟嘌呤	120.1	N^5-甲酸四氢叶酸	−482.8
尿酸	−365.3	N^5-甲基四氢叶酸	−331.0
乳清酸	−587.9	N^5-亚胺甲基四氢叶酸	−317.6
胞核嘧啶	−41.8	环糖	
胸苷	−614.6	树胶醛醣	−746.0
2′-脱氧腺苷	−39.7	利比亚糖	−746.0
腺苷	−207.9	核糖	−753.5
鸟苷	−409.2	核酮糖	−746.8
核苷酸		木糖	−746.0
2′-脱氧胞啶单磷酸(dCMP)	−403.3	木酮糖	−746.8
尿苷单磷酸(UMP)	−812.1	6-脱氧半乳糖	−747.3
3′,5′-环腺苷单磷酸(cAMP)	37.7	Fuculose	−758.6
胞啶单磷酸(CMP)	−572.0	鼠李糖	−747.3
3′,5′-鸟苷单磷酸(cGMP)	−163.6	鼠李酮糖	−758.6
2′-脱氧胸苷单磷酸(dTMP)	−615.0	阿洛糖	−895.8
次黄苷单磷酸(IMP)	−448.9	阿卓糖	−895.8
胸苷单磷酸(TMP)	−783.7	果糖	−906.7
腺苷单磷酸(AMP)	−208.8	半乳糖	−895.8
鸟苷单磷酸(GMP)	−409.6	葡萄糖	−895.8
2′-脱氧胞啶二磷酸(dCDP)	−425.5	艾杜糖	−895.8
尿苷二磷酸(UDP)	−834.3	肌糖	−895.8
胞啶二磷酸(CDP)	−593.7	甘露糖	−955.6

续表

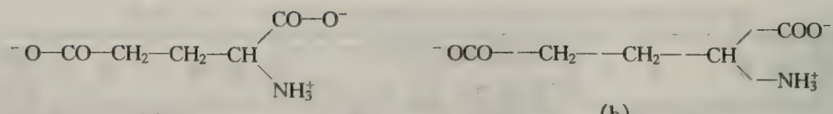
化合物	标准生成吉布斯自由能/kJ·mol⁻¹	化合物	标准生成吉布斯自由能/kJ·mol⁻¹
阿洛酮糖	-895.8	苯酚	-48.5
山梨糖	-906.7	1,4-二噁烷	-200.0
塔格糖	-906.7	苯甲醛	9.6
塔罗糖	-906.7	甲基苯酚酮	3.8
纤维二糖	-895.8	环己醇	114.2
α-乳糖	-1519.6	其它化合物	
β-麦芽糖	-1519.6	嘧啶	116.3
蔗糖	-1519.6	烟酰	-189.1
海藻糖	-1536.4	δ-吡咯啉-5-羧酸	-276.1
纤维三糖	-2143.0	烟碱	-2.5
磷酸根糖		吡咯羧酸	-477.4
5′-磷酸-2′-脱氧核糖	-586.2	尿刊酸	-136.0
5-磷酸树胶醛醣	-754.4	肌酸酐	-28.9
1-磷酸核糖	-745.6	二氢乳清酸	-620.4
5-磷酸核糖	-754.4	2,3-二氢吡啶二羧酸	527.6
1-磷酸 Fuculose	-761.5	5-脱氢莽草酸	-701.2
1-磷酸鼠李酮糖	-761.5	1-哌啶-2,6-二羧酸	-555.6
1-磷酸葡糖醛酸	-1073.6	组氨酸	-223.4
1-磷酸果糖	-907.5	莽草酸	-728.4
6-磷酸果糖	-907.5	葡萄糖酸 γ-内酯	-892.0
1-磷酸半乳糖	-887.4	葡萄糖酸 δ-内酯	-880.3
1-磷酸葡萄糖	-887.4	组氨醇	-37.7
6-磷酸葡萄糖	-896.6	5-脱氢奎尼酸	-930.9
1-磷酸甘露糖	-887.4	果酸	-1092.9
6-磷酸甘露糖	-896.6	葡糖醛酸	-1081.6
1,6-二磷酸果糖	-908.3	咪唑丙酮磷酸	-149.8
1,6-二磷酸葡萄糖	-888.3	苯基丙氨酸	-212.1
1,6-二磷酸蔗糖	-1537.2	奎尼酸	-958.1
碳氢化合物		酪氨酸	-374.0
环丙烷	115.5	δ-葡糖酸内酯-6-磷酸	-880.7
苯	130.1	组氨醇磷酸	-38.1
环己烷	70.7	7,8-二氢生物蝶呤	-107.1
萘	221.3	5,6,7,8-四氢生物蝶呤	-153.6
简单的醇、醛和酯		蝶酸	113.8
呋喃	-68.6	蝶酰谷氨酸	-318.4
四氢呋喃	-99.2		

注：在每个分类中，以各物质的原子个数升序排列。

① 辅酶 A 衍生物的能值以辅酶 A 为基准。也就是，表中所示的能值为：辅酶 A 衍生物的吉布斯自由能减去辅酶 A 的吉布斯自由能。

【例 14.3】 谷氨酸盐生成的吉布斯自由能

谷氨酸的结构式见图 14.2 (a)。为了计算生成吉布斯自由能，把这个结构式分解成如图 14.2 (b) 所示的基团。表 14.14 列出了由每个基团的贡献量及出现次数计算的详细过程。采用了表 14.10 中的原点值，没有作专门的修改。结果值是 $-689\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$，与文献值 $699\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$相差 $10\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$。



(a)　　　　　　　　　　　　(b)

图 14.2　谷氨酸结构（a）及谷氨酸分解后的基团（b）

表 14.14　由各基团贡献值计算谷氨酸生成的吉布斯自由能

基团或修正值	出现次数	贡献/kJ·mol⁻¹	出　处	总贡献
原点值	1	-103.3	表 14.10	-103.3
$—NH_3^+$	1	20.1	表 14.6	20.1
$—COO^-$	2	-298.7	表 14.6	-597.4
$—CH_2—$	2	7.1	表 14.7	14.2
—CH<	1	-22.6	表 14.7	-22.6
总值				-689.0

【例 14.4】　ATP 生成的吉布斯自由能

ATP 是一种复杂的环状化合物，其结构如图 14.3 所示。其整体结构被分解为如图 14.4 所示的基团。注意图 14.4 中还将羟基和磷酸盐基团分成主要的、其次的或第三的三类，并给出了环中化学键的参与及两个杂芳香环的修正。表 14.15 摘要给出了由这些基团贡献计算吉布斯自由能的过程。其结果是 253.5kJ·mol⁻¹，接近于表 14.13 所给出的预先计算的 -252.7kJ·mol⁻¹的值（小偏差是由于舍入误差造成的）。

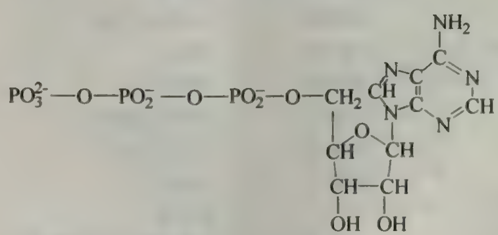


图 14.3　ATP 的结构

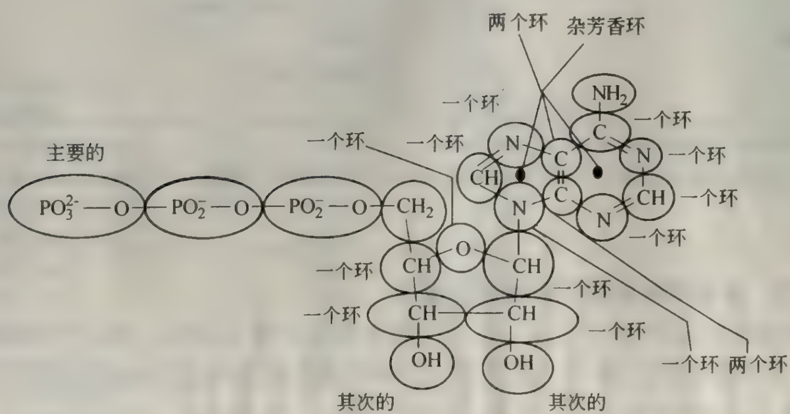


图 14.4　ATP 的结构分解成基团

表 14.15 由各基团贡献值计算 ATP 生成的吉布斯自由能

基团或修正值	出现次数	贡献/$kJ \cdot mol^{-1}$	出　处	总贡献
原点值	1	-103.3	表 14.10	-103.3
$-NH_2$	1	46.0	表 14.6	46.0
$-OPO_3^-$	1	-120.5	表 14.6	-120.5
—OH 其次的	2	-131.4	表 14.6	-262.8
$-CH_2-$	1	7.1	表 14.7	7.1
$-OPO_2-$	2	-21.8	表 14.7	-43.6
环—O—	1	-100.8	表 14.8	-100.8
环 $-\mathrm{CH}<$	4	-10.8	表 14.8	-43.6
环 $-\mathrm{N}<$	1	31.0	表 14.8	31.0
环—CH═	2	40.2	表 14.8	80.4
环═N—	3	43.9	表 14.8	131.7
环 $>\mathrm{C}=$	1	33.1	表 14.8	33.1
两个环 $>\mathrm{C}=$	2	70.7	表 14.9	141.4
杂芳香环	2	-24.7	表 14.10	-49.4
总值				-253.5

现在应该很清楚了，应用基团贡献法最重要的要求就是判定一特定化合物的组成基团。这对像 ATP 这样的复杂分子而言是一种特别的挑战。在这方面，表 14.13 给出的能值很有用，因为他们提供了一个参考点，这个参考点可与一个与表中所给化合物类似的化合物相关联。要使用这个表，只需要辨别出要研究的化合物与表 14.13 中类似的化合物的区别并加上或减去由这一差别的相应贡献就可以。

【例 14.5】 酒精脱氢酶催化反应的 $\Delta G^{0\prime}$ 的计算

我们来研究酒精脱氢酶催化的反应以说明如何由基团贡献的变化直接计算吉布斯自由能。在这个反应中，乙醇转化为乙醛，同时伴随着 NAD^+ 转化为 NADH。如图 14.5 所示，这个反应能分解为各种基团。NADH/NAD^+ 对作为一个单独的基团考虑。计算在表 14.16 中给出，其中忽略了原点和$-CH_3$ 基团的贡献，因为它们无论在乙醇中还是在乙醛中都是相同的，因此它们的净结果为零。这个反应的 $\Delta G^{0\prime}$ 的计算值为 $20.2 kJ \cdot mol^{-1}$。

表 14.16 由各基团的贡献值计算醇脱氢酶催化反应的吉布斯自由能

基团或校正值	出现次数	贡献/$kJ \cdot mol^{-1}$	出　处	总贡献
原点值	0			
H^+	1	-39.7	表 14.11	-39.7
NADH-NAD^+	1	19.8	表 14.12	19.8
$-CH_3$	0			
$-CH_2-$	-1	7.1	表 14.7	-7.1
—OH(主要的)	-1	-119.7	表 14.6	119.7
—CH═O	1	-72.4	表 14.7	-72.4
总值				20.2

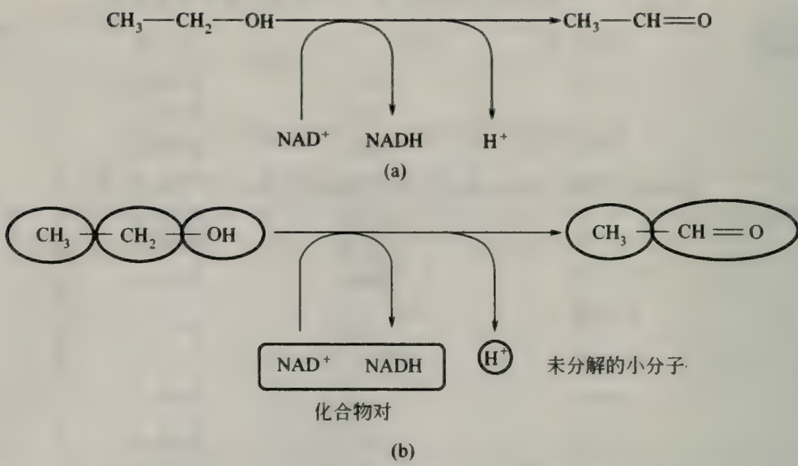


图 14.5 由醇脱氢酶催化的反应（a）及将反应分解为基团，以便估算其吉布斯能（b）

上面所介绍的基团贡献法具有广泛的应用，因为它提供了一组广泛的基团的贡献。对回归拟合中使用的数据点，对 85%的数据点误差估计小于 $8kJ\cdot mol^{-1}$，95%的数据点误差小于 $21kJ\cdot mol^{-1}$。这对吉布斯能和生化系统的平衡常数是可接受的第一级近似，因此这个方法在生化途径的热力学分析中是很有用的。

14.3 非平衡热力学

正如前面提到的，细胞体系是一开放系统，其中许多过程都在远离平衡态下进行。如果它们处于平衡态，就不会有代谢流流经胞内途径，细胞功能就会停止。这可通过跨膜的被动运输过程来说明。通过该过程大量物质从周围环境流入或流出细胞。在平衡时，膜两侧物质浓度相同，因而不会有流动。当有浓度梯度存在时，就会产生一个力推动化合物沿浓度降低的方向流动。在被动运输过程中，有一个热力学推动力即浓度梯度，在推动力和由此产生的流之间有直接的联系，常称为共轭流（conjugate flow）。在大多数细胞过程中，流都是共轭的，但某些情况下热力学力也会导致一非共轭流。例如在氧化磷酸化过程中，ADP 磷酸化生成 ATP 的过程就是真核细胞的线粒体内膜（或原核细胞的细胞质膜）两侧的质子梯度推动的。这一热力学激发的非共轭流常被称为能量转导（energy transduction）。

非平衡热力学是经典热力学向非平衡状态的推广。它所研究的主要问题就是热力学推动力和流（例如反应或转化的速率）之间的关系，包括共轭流与非共轭流。此外，非平衡热力学还涉及不同细胞过程间的相互作用问题，例如在氧化磷酸化的各个过程，其中能量转导具有重要作用。非平衡热力学的基础是流-力（flow-force）关系，流响应于热力学推动力而产生并且是该力的函数。对一化学反应，推动力可以由亲和力 A_i 来量化，它是该反应自由能变化的负数。因此，对反应 i 有式（14.34）：

$$A_i = -\Delta G_i = -\sum_{j=1}^{C} g_{ij}\mu_j \tag{14.34}$$

式中，g_{ij}和 μ_j 分别是第 j 个化合物的化学计量系数和化学势。其它的热力学力，如氧化磷酸化过程中的质子动力（proton-motive force）（见例 14.6）也可能起到推动力的作用，在下面的讨论中，用变量 A_i 来表示此种推动力。如前一节所讨论的，一个自发反应需要负

的自由能变化，其对应于 $A_i \geqslant 0$。但是由于热力学耦合现象，并非所有过程都需要一个非负的亲和力，因为某些过程可以被其它具有正亲和力的过程推动。例如 EMP 途径中的丙糖磷酸异构酶催化反应就具有负的亲和力（或一个正的自由能变化，见表 14.3）。但在途径中其它后续反应的推动下由磷酸二羟基丙酮到 3-磷酸甘油醛的转化确实发生了。因此生物过程 i 自发性的特定必要条件 $A_i \geqslant 0$ 可以用必要条件整体亲和力（orerall affinity）非负代替，整体亲和力由推动整体生物过程 i 的所有单个过程计算得到。在评价过程 i 的整体亲和力时，A_i 也被称为耗散函数（dissipation function）$\boldsymbol{\Phi}_i$（$kJ \cdot h^{-1}$），在计算时很重要的一点就是要考虑到各个单个过程推动过程 i 的相对速率，用下式表示：

$$A_i = \boldsymbol{\Phi}_i = \sum_{j=1}^{J} v_j A_{ij} \tag{14.35}$$

式中，v_j 是过程中第 j 个反应（或过程）的速率（$mol \cdot h^{-1}$），A_{ij} 是该反应对过程 i 整体亲和力（或推动力）的贡献。考虑到耗散函数是反应速率的函数，因此引入了时间变量。此外，它代表了多个不同过程的整体耗散，因此只要耗散函数保持非负就允许某些单个亲和力为负（或正的自由能变化）的过程同时进行。这两方面是其对平衡热力学的主要偏离，在平衡热力学中每个反应的可行性仅由其自身的自由能变化决定。

为了举例说明由耗散函数表示的热力学耦合现象，现在考察包括两个分反应（partial reaction）的反应如 EMP 途径中的己糖激酶催化反应。第一个分反应是葡萄糖磷酸化生成 6-磷酸葡萄糖：

$$\underset{\text{(6-磷酸葡萄糖)}}{\text{glucose-6-phosphate}} - \underset{\text{(葡萄糖)}}{\text{glucose}} - P_i = 0 \tag{14.36}$$

第二个分反应是 ATP 水解生成 ADP 和磷酸：

$$ADP + P_i - ATP = 0 \tag{14.37}$$

第一个分反应的标准自由能变化为 $14.8 kJ \cdot mol^{-1}$，第二个分反应的为 $-30.5 kJ \cdot mol^{-1}$。即使在生理条件下第一个分反应的自由能变化 ΔG 也是正的（对应一负的亲和力），因此其不能自发正向进行。但是通过与第二个反应的耦合，可能有一个整体自由能耗散过程。总的耗散函数为：

$$\boldsymbol{\Phi} = v_{ATP} A_{ATP} + v_{glc} A_{glc} \tag{14.38}$$

或对亲和力引入自由能变化方程式（14.12）得：

$$\boldsymbol{\Phi} = v_{ATP}(\mu_{ATP} - \mu_{ADP} - \mu_{P_i}) + v_{glc}(\mu_{glc} + \mu_{P_i} - \mu_{glc6P}) \tag{14.39}$$

两个反应的速率不是相互独立的，因为己糖激酶催化葡萄糖磷酸化的反应只有在另一反应同时进行时才可进行。因此 $v_{glc} = v_{ATP}$，式（14.39）简化为

$$\boldsymbol{\Phi} = v_{glc}(\mu_{glc} + \mu_{ATP} - \mu_{ADP} - \mu_{glc6P}) \tag{14.40}$$

其在所有生理条件下都是正的。

前面的己糖激酶催化反应例子说明了两个反应的热力学耦合现象，这些反应常被当作一个整体反应处理。还有许多类似的例子，但更有趣的是考虑独立过程（即由不同的酶催化的过程）的热力学耦合现象。例如氧化磷酸化过程中各个单独的过程由热力学约束所耦合（参见例 14.6），或一些胞内反应与辅因子的转化过程如 NAD^+ 到 NADH 相耦合。后者提供了许多不同代谢途径之间进行热力学耦合的方法。此外，代谢途径中两个连续反应可以通过中间代谢物在热力学上相耦合，中间代谢物通过其浓度影响生成它及消耗它的反应的亲和力。

这些不同的热力学耦合过程可通过所谓的表观方程（phenomenological equations）描述，其用下式来表示力和流之间的关系：

$$v_i = -\sum_{j=1}^{J} L_{ij}A_j \tag{14.41}$$

式中，L_{ij}是表观系数（phenomenological coefficient)。可以看到每一个流 v_i（或反应速率）都通过一直接系数（direct coefficient）L_{ii}与其共轭推动力 A_i 相关联，而与其它推动力 A_j 通过交叉系数（cross-coefficient）L_{ij}相关联。

表观方程与其它描述力和流之间线性关系的方程类似，如描述电流流动的欧姆方程，费克扩散方程，泊肃流体流动方程等。此外，表观方程已推广为包括所有的交叉影响和干扰。它们只有对较慢的过程才严格满足，即足够接近于平衡态的过程。快的反应需要加入高阶项［详见 Westerhoff and van Dam（1987)］，这就会限制方程的实际应用。但是对大多数细胞过程尤其是运输过程，惊奇地发现线性关系在推动力很宽的数量级范围内都满足（Caplan，1971)。对化学反应这一规则常常是更加限制的，但正如后面要说明的，线性常常是一个很好的近似。

表观系数是系统参数（动力学，运输及其它过程）的函数，因此不是常数（见方框 14.3 和下面)。但这些系数也不能任意取值，因为正如 Onsager（1931）的经典工作所指出的它们要满足一些重要的热力学约束。第一，系数矩阵是对称的，即

$$L_{ij} = L_{ji};\ i \neq j \tag{14.42}$$

这些一般被称为 Onsager 倒数关系（或者简称为 Onsager 定律)。它说明了某一力 A_j 对某一流 ν_i 相对影响的一阶近似与相反的力流对（force-flow）的相对影响的一阶近似相同。这一倒数关系只有在接近平衡时才严格成立（见方框 14.3)。第二，直接系数永不能为负，即 $L_{ii} \geqslant 0$，而交叉系数必须满足以下条件：

$$L_{ij}^2 \leqslant L_{ii}L_{jj};\ i \neq j \tag{14.43}$$

这两个对于表观系数的约束可以在所有条件下耗散函数都不能为负的要求中推导得到［详见 Westerhoff and van Dam（1987)］。

表观方程可用来描述许多不同过程间的相互作用，但常常仅考虑两个流相耦合的系统，如下所示：

$$v_1 = L_{11}A_1 + L_{12}A_2 \tag{14.44a}$$

$$v_2 = L_{21}A_1 + L_{22}A_2 \tag{14.44b}$$

其中，倒数关系预示 $L_{12} = L_{21}$。一般情况下，一个流常在另一个流提供的自由能推动下逆向进行。此时提供自由能的流作为输入流，而通过由这些流所提供的自由能的消耗被输入流所推动的流称为输出流。对这样一个系统，交叉系数 L_{12}定量反映了输入和输出过程间的耦合程度。但是，L_{12}本身的大小并不是耦合程度的很好量度。其通过交叉系数与直接系数之比的值来量度更好。所谓的耦合度（degree of coupling）q 就用来表示这一关系：

$$q = \frac{L_{12}}{\sqrt{L_{11}L_{22}}} \tag{14.45}$$

由于式（14.43）的限定，耦合度的绝对值确定总是小于或等于 1。当 $q=1$ 时系统完全耦合，即两个流互相成正比，因而系统可用一单个化学计量过程很好表示。当 $q=0$ 时系统完全不耦合，因此在考虑能量转化时可不予考虑。

对二流系统（two-flow system）一个有意义的变量是所谓的流比（flow ratio)，其定义

为输出流对输入流之比：

$$j=\frac{v_1}{v_2}=\frac{L_{11}A_1+L_{12}A_2}{L_{12}A_1+L_{22}A_2} \tag{14.46}$$

式中，v_i 是输出流（A_i 是相应的输出力）。重排式（14.46）得到：

$$j=Z\frac{(Z\chi)+q}{q(Z\chi)+1} \tag{14.47}$$

其中 Z 是由下式给出的表观计量系数（phenomenological stoichiometry）（Westerhoff and van Dam，1987)：

$$Z=\sqrt{\frac{L_{11}}{L_{22}}} \tag{14.48}$$

χ 是力比（force ratio)，为输出力对输入力之比：

$$\chi=\frac{A_1}{A_2} \tag{14.49}$$

方框 14.3　流-力关系和倒数关系

在本条目中，进一步详细描述式（14.2）线性流-力关系的有效性和式（14.43）所示的 Onsager 的倒数关系。

流-力关系

为了举例说明线性流-力关系的推导和有效性，考虑一个由底物 S 转化为产物 P 的简单化学反应

$$\mathrm{P}-\mathrm{S}=0 \tag{1}$$

对该反应，正反应净速率为：

$$v=k_1c_{\mathrm{S}}-k_{-1}c_{\mathrm{P}} \tag{2}$$

从化学势的定义［式（14.10)］，能将 S 和 P 的浓度表示为：

$$c_i=c_{i,\mathrm{ref}}\exp\left(\frac{\mu_i-\mu_i^{\mathrm{ref}}}{RT}\right)\qquad I=\mathrm{S,P} \tag{3}$$

将式（3）代入式（2)，得：

$$v=k_1c_{\mathrm{S,ref}}\exp\left(\frac{\mu_{\mathrm{S}}-\mu_{\mathrm{S}}^{\mathrm{ref}}}{RT}\right)-k_{-1}c_{\mathrm{P,ref}}\exp\left(\frac{\mu_{\mathrm{P}}-\mu_{\mathrm{P}}^{\mathrm{ref}}}{RT}\right) \tag{4}$$

这是该化学反应的一个完整的非平衡热力学的描述，其表示反应速率是底物及产物化学势还有一组动力学参数的函数。如果考虑浓度处于接近参考态的区域，这里

$$|\mu_{\mathrm{S}}-\mu_{\mathrm{S}}^{\mathrm{ref}}|\ll RT\gg|\mu_{\mathrm{P}}-\mu_{\mathrm{P}}^{\mathrm{ref}}| \tag{5}$$

有近似式 $e^x\approx1+x$（对于 $x\ll1$)，由此能将式（4）近似表示为：

$$v=\frac{k_1c_{\mathrm{S,ref}}}{RT}(\mu_{\mathrm{S}}-\mu_{\mathrm{S}}^{\mathrm{ref}})-\frac{k_{-1}c_{\mathrm{P,ref}}}{RT}(\mu_{\mathrm{P}}-\mu_{\mathrm{P}}^{\mathrm{ref}})+k_1c_{\mathrm{S,ref}}-k_{-1}c_{\mathrm{P,ref}} \tag{6}$$

如果参考态取为平衡态，则 $k_1c_{\mathrm{S,ref}}=k_{-1}c_{\mathrm{P,ref}}$。此外，在平衡态时底物和产物的化学势是相同的。于是式（6）简化为：

$$v=\frac{k_1c_{\mathrm{S,ref}}}{RT}(\mu_{\mathrm{S}}-\mu_{\mathrm{P}})=L(\mu_{\mathrm{S}}-\mu_{\mathrm{P}}) \tag{7}$$

其证明了对于在接近与平衡条件下进行的简单化学反应，流-力关系的有效性。可以看

出，表观系数是反应动力学参数的函数，因而它们不能被当作常数，特别是对生物系统，其动力学参数取决于体内的酶活。Westerhoff 和 van Dam（1987）表明对很多其它系统，例如耦合反应和运输过程，流-力关系也能导出。在式（7）的推导中，接近平衡这一需要能被量化，即通过式（5），其必须被满足。由于在 25℃ 时 RT 是 $2.48\mathrm{kJ\cdot mol^{-1}}$，从表 14.3 看出 EMP 途径中的几个反应，酶自由能变化小于 RT（或非常接近它），因此线性流-力关系可应用于它们。然而对自由能变化很大的反应（热力学上不可逆的反应），接近平衡假定明显很差，因此建议在应用线性流-力关系时要特别谨慎。

倒数关系

细胞生长是大量过程的（包括物质的运转和化学反应）结果。这些过程中很多是耦合的，而其它一些是独立的，因此该系统可被考虑为一组独立的子过程，其中每个子过程可以包括一个单个过程或两个或更多的耦合过程。在分析总生长过程中，人们常常用一种黑箱方法，其中对所有独立子过程假定处于稳态。在这种分析中，有趣的是要知道是否 Onsager 的倒数关系适用于底物到代谢产物和生物质的总转换（或任何代表几个子过程相加的其它过程）。Westerhoff 和 van Dam（1987）考虑了这种局面并表明如果倒数关系适用于每组耦合过程，那么它也适用于总过程。

为了说明对于流-力关系对倒数关系的有效性接近于平衡条件的严格需要，我们开始考虑简单化学反应（1），其正反应净速率由式（2）给出。用这种动力学，P 的生成速率 v_{P} 是 v，而 S 的生成速率是 $v_{\mathrm{S}}=-v$。这样，我们就可能推导出所谓的一般化的表观系数如下：

$$L_{\mathrm{SP}}^{\mathrm{gen}}=\frac{\partial v_{\mathrm{S}}}{\partial \mu_{\mathrm{P}}}=\frac{k_{-1}c_{\mathrm{P}}}{RT} \tag{8}$$

$$L_{\mathrm{SP}}^{\mathrm{gen}}=\frac{\partial v_{\mathrm{P}}}{\partial \mu_{\mathrm{S}}}=\frac{k_{1}c_{\mathrm{S}}}{RT} \tag{9}$$

[提示：用化学势式（4.10）得出 μ_i 然后确定其导数]。很明显，两个一般化的表观系数仅在平衡时才相同，平衡时反应的净速率为零（因此，$k_1c_{\mathrm{S}}=k_{-1}c_{\mathrm{P}}$）。离开平衡，这两个一般化的表观系数不服从倒数关系，而且它们的差等于反应的净速率被 RT 除。Westerhoff 和 van Dam（1987）对具有复杂动力学的化学反应及对两个部分耦合的过程推出了一般化的表观系数。在两种情况下，上述结论是有效的：导数关系仅在平衡（或非常接近于平衡）时才成立。尽管这种事实，对一些在远离平衡条件下进行的系统，倒数关系仍从实验中获得（Rottenberg，1979），这表明 Onsager 倒数关系更普遍的适用性。

由于力通常具有相反的符号（一个具有正推动力的过程推动一具有负推动力的过程），力比一般是负的。在 $q=\pm1$ 即完全耦合时，流比等于 Z，表观计量系数与机理计量系数（mechanistic stoichiometry）相同。当 $q\neq\pm1$ 时就不是这种情况，即使在氧化磷酸化过程（见例 14.6）中 Z 常常与机理计量系数有关联。对大量的耦合过程式（14.47）是确定操作计量系数（operational stoichiometry）（等于流比）的基础。图 14.6 所示为在不同耦合程度下流比（相对于 Z）与力比的关系。可以看出 q 越接近 1（对 q 接近 -1 也是相同情况）则流比对力比的依赖程度越弱。当 q 为零时，流比与力比成正比，即每个流都与其共轭力成

正比而不受其它力的影响。通过测量力比与耦合度，操作计量系数可以确定为 Z 的函数。此外，通过没有输出流的条件（$v_1=0$，流比为零）下的力比的测量可以确定该条件下的表观计量系数，该条件常被称为静头（static head）。这使得可以用例 14.6 所说明的方法确定操作计量系数。式(14.47）也被用来确定各种运输过程的计量系数，例如大肠杆菌中通过质子同向转运而吸收乳糖(Rottenberg，1979)。表观计量系数亦可在力比为零，即 $A_1=0$ 的条件下通过测量流比来确定，该条件被称为水平流（level flow）。

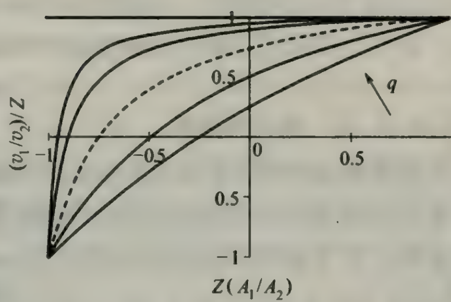


图 14.6　在不同耦合度(q)水平下，流比/表观计量学[$j/Z=\dfrac{v_1/v_2}{Z}$，见式(14.47)]与标准化的力比[$Z\chi=Z(A_1/A_2)$]间的函数关系

能量转导的一般过程中一个值得关注的定量参数是热力学效率。其被定义为输出自由能的产生速率除以输入自由能的消耗速率：

$$\eta_{\text{th}}=-\frac{v_1A_1}{v_2A_2}=-j\chi=-(Z\chi)\frac{(Z\chi)+q}{q(Z\chi)+1} \tag{14.50}$$

可以看出热力学效率是三个变量的函数：耦合度 q、表观计量系数 Z 和力比 χ。但是由于 Z 和 χ 同时出现，热力学效率实际上仅是两个变量的函数，即 q 和 $Z\chi$。图 14.7 示出了不同耦合度下热力学效率和 $Z\chi$ 的关系。可以看出 $q<1$ 时热力学效率经过了一最大值，并且这一最大值决定于耦合度。由式（14.50）很容易看出最大热力学效率是在力比为以下值时得到的：

$$\chi_{\text{opt}}=-\frac{q}{Z(1+\sqrt{1-q^2})} \tag{14.51}$$

其对应的最优热力学效率为：

$$\eta_{\text{th,opt}}=(\chi_{\text{opt}}Z)^2=\frac{q^2}{(1+\sqrt{1-q^2})^2} \tag{14.52}$$

虽然最大化系统的热力学效率看起来很有吸引力，但这样一个最大值是否就是整体系统的真实最优值还不清楚。例如，考虑完全耦合即 $q=1$ 的情况，此时在力比为 $-1/Z$ 时热力学效率达到最高值 1。但是这一条件对应于平衡态，没有净流。因此虽然过程效率很高，却是没有用的。为了使过程进行，力比必须要大于 $-1/Z$，即 $Z\chi$ 要大于 -1，这意味着热力学效率要降低（见图 14.7)。因此要使自由能转导过程发生就必须牺牲部分效率(Westerhoff and van Dam，1987)。还不清楚何种力比对应速率和效率的最佳兼顾，很可能这一兼顾会因不同体系而异。Kedem 和 Caplan（1965）考察了所谓最大输出的一种可能兼顾，在该兼顾下 v_1A_1 被最优化。可以看出在任意耦合度下得到最大输出的力比都小于得到最优热力学效率的力比（Wester-

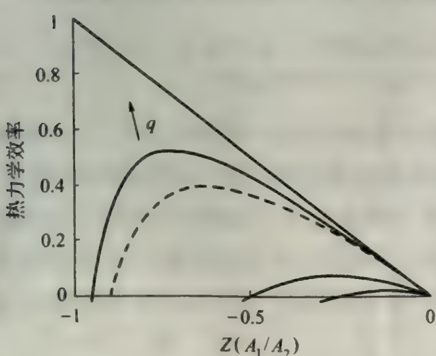


图 14.7　在不同耦合度（q）水平下，自由能转换器的热力学效率［η_{th}，见式（14.44)］与标准化的力比［$Z\chi=Z(A_1/A_2)$］间的函数关系

hoff and van Dam，1987)。这些考虑都清楚地表明一般说来最大效率并不等于系统的最优状态，因为在该状态下输出过程的速率可能太低。

【例 14.6】 氧化磷酸化

氧化磷酸化的机理最近由 Senior(1988) 作了综述并在本书第 2.2.3 节中作了介绍。建议读者在阅读本例非平衡热力学处理之前复习那一节。这里应用非平衡热力学对该过程进行定量分析并推导实际操作状况下的 P/O，它是工程上好氧过程能量代谢的一个重要参数(参见例 3.3)。

基本上，由氧将 NADH 氧化生成 NAD^+ 过程中产生的大量自由能都用于推动磷酸化过程。两个过程可以写为：

$$NAD^+ + H_2O - NADH - 0.5O_2 - H^+ = 0 \tag{1}$$

$$ATP + H_2O - ADP - P_i = 0 \tag{2}$$

NADH 氧化的标准自由能变化可以通过考虑下面的两个单一电极反应计算出：

$$H_2O - 0.5O_2 - 2H^+ - 2e^- = 0; \quad \varepsilon^{0\prime} = -0.815V \tag{3}$$

$$-NADH + NAD^+ + H^+ + 2e^- = 0; \quad \varepsilon^{0\prime} = -0.315V \tag{4}$$

反应式 (1) 由式 (3) 和式 (4) 相加得到，因而得到下面的标准自由能估计值：

$$\Delta G^{0\prime} = nF\Delta\varepsilon^{0\prime} = 2\times 96.494(kJ\cdot V^{-1}\cdot mol^{-1})(-1.13V) = -218kJ\cdot mol^{-1} \tag{5}$$

该过程产生足够的自由能推动 ADP 磷酸化生成 ATP［反应 (2) 的标准吉布斯自由能变化是 $30.5kJ\cdot mol^{-1}$］，这使得每摩尔被氧化的 NADH 可以生成多于 1mol 的 ATP。根据化学渗透理论（见图 2.11)，这两个过程是通过反应 (3) 和反应 (4) 产生的质子和电势梯度耦合的，并利用质子梯度来推动磷酸化反应 (2)。ATP 的合成是由膜结合的 F_0F_1-ATP 酶复合物介导的。蛋白的圆形的 F_1 部分嵌入细胞质内（对原核细胞）或线粒体基质内（对真核细胞)，其上的 ADP 与磷酸之间的反应进行得相当快，但只有在有稳定的质子流通过跨膜（细胞质膜或线粒体内膜）的蛋白质的茎型的 F_0 部分时，合成的 ATP 才能脱离 F_1 使得 ATP 可以连续不断地生成。因此，向 F_0 的质子流对将 ATP 从 F_1 上释放出来是非常必要的，该质子流的最终结果就是产生足够多的自由能以推动磷酸化反应 (2) 对抗其负的亲和力。磷酸化反应的推动力被提出化学渗透理论的 Mitchell (1961) 称为质子动力 (proton-motive force)，其可由下式给出：

$$\Delta p = \frac{\Delta\mu_{H^+}}{F} = \Delta\Psi - 2.303\frac{RT}{F}\Delta pH = \Delta\Psi - 0.059\Delta pH \tag{6}$$

$\Delta\mu_{H^+}$是作为膜电位（等于 $\Delta\Psi/F$）的贡献和质子梯度的贡献的加和而被确定的。Δp 的单位是 $V\cdot mol^{-1}$。$\Delta\Psi$ 是每摩尔质子传递时造成的以伏特表示的膜电位（膜的内侧更偏负，因此 $\Delta\Psi$ 为正，其值大约为 0.15V)。ΔpH 是膜两侧的 pH 值差（一般为 −0.05)。由此计算出质子动力为 $0.153V\cdot mol^{-1}$ (H^+)，对应自由能为 $14.75kJ\cdot mol^{-1}$（质子)。要注意到大部分的质子动力来源于电位差。pH 值差的贡献是最小的，这说明了为什么在原核细胞中氧化磷酸化过程可在非常高的胞外 pH 值下进行。

基于上面的叙述，氧化磷酸化过程可被设想为包含四步的循环过程：两个标量的化学反应和两个矢量的传递过程。一个传递过程（质子外流）和一个化学反应（磷酸化）的亲和力为负，而另外两个过程（质子内流和氧化）的亲和力是足够地正以确保整个系统的耗散函数［式 (14.35)］为正。因为质子外流和氧化反应及质子内流和磷酸化反应从两个不同方面紧

密耦合，可以将这四个过程组合为两对：(1) 氧化伴随质子外流，(2)磷酸化伴随质子内流。对每摩尔被氧化的 NADH，两个过程的总亲和力可由下式给出：

$$A_o = A_o^0 - n_o F \Delta p \tag{7}$$

$$A_p = A_p^0 + n_p F \Delta p \tag{8}$$

A_p 常被称为磷酸化势。A_o^0 等于氧化反应的自由能变化的负数，它是大的正值。A_p^0 是负的并且等于磷酸化反应的自由能变化的负数。n_o 是伴随氧化反应的质子泵出数目，n_p 是伴随磷酸化反应的质子流入数目。它们的值并不确切知道，但对真核细胞 n_o 常取 12（相应于复合物Ⅰ，Ⅱ和复合物Ⅳ上每个有四个质子，见图 2.11），n_p 取 2 或 3（每多流入 1mol 质子就伴随细胞质和线粒体基质膜间交换 ATP 和 ADP 及磷酸）。

与表观方程一致，现在将两个过程的速率写为其亲和力的线性函数：

$$v_o = L_{oo} A_o + L_{op} A_p \tag{9}$$

$$v_p = L_{po} A_o + L_{pp} A_p \tag{10}$$

Onsager 倒数关系意味着 $L_{op} = L_{po}$。由前面的氧化磷酸化模型可知流比（v_p/v_o）等于操作状态下的 P/O，因此确定生理条件下的这一比例很有意义。力比 χ 可由分离出的线粒体测出，如果耦合度和表观计量系数已知，则可由方程式（14.47）计算出实际计量系数。

耦合度可由静头（没有输出流，即 $v_p = 0$）和水平流（输出力为零，即 $A_p = 0$）条件下呼吸速率的测量来确定。将这些条件应用于式（9）和式（10）中并消去表观系数得到：

$$\frac{(v_p)_{v_o=0}}{(v_p)_{A_o=0}} = 1 - q^2 \tag{11}$$

在大多数能量守恒的膜中，由于输出力被推动到其最大电位，静头条件（$v_p = 0$）可以很快达到，因此方程式（11）中的分子很容易确定。但是水平流的条件却很难达到，因为一般情况下要完全消除输出力的势是不可能的（Rottenberg，1979）。即便如此，q 还是可以通过在静头和其它势非常低的参考状态下测得的输入反应速率（在此情况下是呼吸速率）计算得到。但在这种情况下，静头的输入势（A_p^{static}）值和参考状态下的输出势（A_p^{ref}）值也必须知道。随后耦合度可由下式算出（Rottenberg，1979）：

$$q^2 = \frac{A_p^{static}(1 - R_c)}{A_p^{ref} - A_p^{static} R_c} \tag{12}$$

式中，R_c 是参考态下和静头条件下氧化速率之比。

$$R_c = \frac{v_o^{ref}}{v_o^{static}} \tag{13}$$

为了定量耦合度，参考状态取为磷酸化的状态。磷酸化过程中和 ADP 被耗尽后的氧化速率之比大约为 6（$= R_c$）。此外，静头时的磷酸化势 A_p^{static} 为大约 63kJ·mol^{-1}，ADP 加入后为 42kJ·mol^{-1}（Rottenberg，1979）。由此应用式（12）得到耦合度为 0.97。

表观计量系数 Z 可通过测量静头条件下的力比 χ 得到，该条件下流比 j 为零，因此由式（14.47）得：

$$Z\chi^{static} + q = 0 \tag{14}$$

对NADH的氧化静头条件下的力比 χ^{static} 约为 -0.31，对琥珀酸的氧化为 -0.46（Rottenberg，1979）。由此得到的表观计量系数对 NADH 的氧化约为 3.0，对琥珀酸的氧化为 2.0。这与一般报告的氧化磷酸化的机理系数值非常符合，但这只是偶然巧合，将在后面

讨论。

取 Z 的值为 3(NADH 氧化)，则由式（14.47）可将操作 P/O 写为力比的函数：

$$P/O=\frac{v_p}{v_o}=3.0\times\frac{3.0\chi+0.94}{2.82\chi+1} \tag{15}$$

图 14.8 汇总了这一结果。当力比小于 −0.313 时 P/O 值开始为负。这对应于 ATP 酶反向工作时的情况，即其消耗 ATP 而将质子泵出。力比在该值以上时 P/O 比增加很快，当力比为 −0.15 时 P/O 比已达到其最大值的 85%，为 2.82。用上面确定的参数值，由式（14.51）可以计算出热力学效率最高时的力比为 −0.23，这对应于 P/O 比为 2.1。在此力比时，热力学效率为 0.49［从式（14.52）求得］。要注意到当耦合度从 1 降到 0.94 时最优热力学效率大大降低。

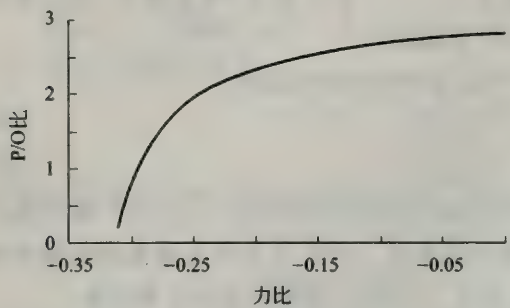


图 14.8　氧化磷酸化过程中 P/O 比与力比的函数关系

Stucki（1980）应用分离出的肝细胞线粒体研究了氧化磷酸化过程。通过在分离的线粒体中添加不同活性的己糖激酶可以使磷酸势改变。通过测量不同磷酸化势下的磷酸化程度和呼吸速率，可以由速率对磷酸化势的斜率计算出方程式（9）和式（10）中的表观系数 L_{op} 和 L_{pp}。通过计算输入力，另外两个表观系数可以通过相应曲线的截距得到。由这些表观系数可求得耦合度为 0.95，表观计量系数为 2.84。这些参数值和前面得到的值非常接近。在这些实验中，力比在 −0.31 和 −0.25 之间变化［类似的数字在 Westerhoff and van Dam（1987）中给出］。由 Stucki（1980）得到的 q 和 Z 的值，这相当于操作磷氧比 P/O 范围为 1.2～2.1。还不知道为什么力比在体内条件下变化如此大，但要注意的一点是力比似乎要在一个能对操作磷氧比 P/O 产生较大影响的范围内（见图 14.8）。当力比在上述区间时，热力学效率在 0.37～0.52 之间。

上述量化操作磷氧比 P/O 的过程曾被 Westerhoff 和 van Dam（1987）认真地质疑过。首先，由方程式（9）和式（10）描述的线性关系只有在接近平衡条件下才成立，而其是上述整个分析的基础。但是 Rottenberg（1979）和 Stucki（1980）（及其他人）报告的实验数据表明线性确实很好。Stucki（1980）通过实验确定表观系数表明甚至于倒数关系也是一个站得住脚的假定。第二，这一分析是通过某些特殊条件推断体内条件。耦合度和表观计量系数都是在极端状态（静头）下测量得到的。q 和 Z 都是表观系数的函数，因此也依赖于特定的生理条件例如 ATP 酶的活性。因此非常可能它们会在不同的生理状态下取不同值。Z 的外推是非常关键的，因为它在生理条件下可以显著违反机理化学计量学。考虑到对氧化磷酸化过程的上述非平衡热力学分析的不足，Lemasters 及其合作者（Lemasters and Billica，1981；Lemasters et al，1984）强调 q 和 Z 仍然提供了机理计量系数的上限和下限，即机理计量系数介于 $-qZ$ 和 $-Z/q$ 之间。因为 q 值一般接近于 1，将 Z 作为机理系数的误差是很小的。

上述氧化磷酸化过程的非平衡热力学模型有助于说明如何应用非平衡热力学分析复杂的生物系统。但人们应该知道黑箱模型代表了显著的简化。Westerhoff 和 van Dam（1987）在

其对生物系统非平衡热力学的广博的专著中给出了一个氧化磷酸化过程的更详尽模型。在该模型中跨越膜的净质子通量也被包括了（参见例 11.3）。应用该模型，ATP 酶和呼吸链质子泵的计量系数被分别确定，并由其确定了机理计量系数。此外，由这一更详细的模型他们表明表观计量系数是系统动力学参数如 ATP 酶活性的函数。

【例 14.7】 应用非平衡热力学描述细胞生长过程

在黑箱模型中，细胞的生长是用一输入培养基形式自由能、输出生物质形式自由能的总过程来表示的。输入和输出流通过很多细胞内反应及 ATP 的产生和利用而耦合起来。因此细胞生长过程可以描述为输入流为 r_c，即异化代谢速率（C-mol 底物·C-mol 生物质$^{-1}$·h^{-1}）和输出流为 r_a，即同化代谢速率（C-mol 生物质·C-mol 生物质$^{-1}$·h^{-1}）的自由能转换器。

$$r_c = L_{cc}A_c + L_{ac}A_a \tag{1}$$

$$r_a = L_{ac}A_c + L_{aa}A_a \tag{2}$$

这里应用了 Onsager 的倒数关系。对葡萄糖上的好氧生长，输入流的推进力（A_c）是葡萄糖氧化成二氧化碳和水的过程的亲和力（或负自由能变化）：

$$A_c = -\Delta G_c^{0\prime} + RT\ln\left(\frac{c_{glc}c_{O_2}^6}{c_{CO_2}^6}\right) \tag{3}$$

其中葡萄糖氧化的标准自由能变化是大约 2.9MJ·mol^{-1}。因此输入流的推动力决定于葡萄糖浓度。类似地，对输出流，推动力如下式所示：

$$A_a = -\Delta G_a^{0\prime} - RT\ln\left(\frac{c_x}{\prod_i c_{i,anab}}\right) \tag{4}$$

式中，$c_{i,anab}$是合成代谢的培养基浓度。在前面的黑箱模型中，分解代谢流通过葡萄糖利用速率给出，因此葡萄糖不应该作为合成代谢的培养基。相反，合成代谢反应的碳源应该是二氧化碳。由 CO_2，N_2 和水等合成生物质的标准自由能是大约 536kJ·C-mol^{-1}，而由 CO_2，NH_4^+ 和水等合成的标准自由能是大约 490kJ·C-mol^{-1}（Roels，1983）。

如果考虑葡萄糖限制时的恒化器培养条件下的稳态生长（浓度恒定），此时 A_a 一般恒定。如果从式（1）和式（2）消除变化着的力 A_c，就可以得到：

$$r_c = \frac{1}{qZ}r_a + L_{ac}\left(1 - \frac{1}{q^2}\right)A_a \tag{5}$$

这和式（3.26）给出的比生长速率和底物比消耗速率之间经典的线性关系是等同的。上式中：

$$Y_{sx}^{true} = \frac{1}{Y_{xs}^{true}} = qZ \tag{6}$$

$$m_s = L_{ac}\left(1 - \frac{1}{q^2}\right)A_a \tag{7}$$

由式（6）可见，只有当 $q=1$ 时，系统的表观计量系数 Z 等于其机理计量系数 Y_{sx}^{true}。显然在这种情况下过程完美地耦合，没有自由能浪费于无效循环中或者维持过程中。式（7）表明，表观系数 L_{ac}不是常数，而是维持系数、比生长速率和耦合参数的函数。

式（2）和式（3）结合可以得出比生长速率和葡萄糖浓度之间的关系。如果仍维持葡萄

糖限制条件，即 A_a 恒定，并且溶解氧和二氧化碳同时保持恒定，即可得到：

$$r_a = L_{ac}RT\ln(c_{glc}) + a \tag{8}$$

式中，a 是常数。式（8）表明了比生长速率和限制培养基浓度之间是对数关系，这不同于经典的饱和型（Monod）动力学。然而，它和 Monod 动力学一样可以描述大部分实验数据。图 14.9 对饱和型动力学和对数函数进行了比较。只有在高底物浓度时，对数函数偏离饱和型动力学。从这两种形式的动力学比较中，发现对数函数的参数和 Monod 参数有如下关系：

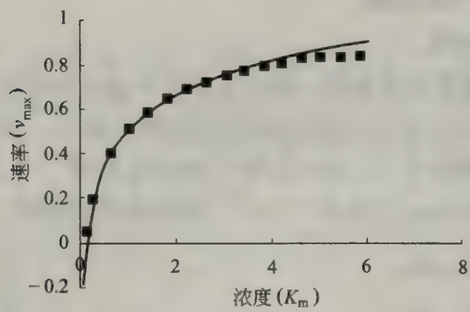


图 14.9　Monod 动力学（数据点）和对数函数式（8）的比较

对数函数中的参数 $L_{ac}RT=0.23$，$a=0.5$。坐标轴分别被 Monod 模型参数（v_{max}和 K_m）定标

$$\left.\begin{aligned} L_{ac}RT &\approx 0.23\mu_{max} \\ a &\approx 0.5-0.23\mu_{max}\ln(K_m) \end{aligned}\right\} \tag{9}$$

如果最大比生长率是已知的，式（9）就可以用以决定表观系数 L_{ac}。

本例中提出的非平衡态热力学黑箱模型能很好地说明耦合过程的概念。在生长情况下，分解代谢和合成代谢间有着紧密的耦合。但是由于维持过程耦合并不完美，这可以和氧化磷酸化中的质子泄漏相比。Westerhoff 和 van Dam（1987）提出了更详细的非平衡态生长模型，其包括 ATP 流（他们使用术语“镶嵌非平衡热力学模型”以区别于上述例子中的简单黑箱模型）。这个详细的模型可以在更为基础的水平上独立估算生长过程参数，即 Y_{xATP}和 m_{ATP}（见 3.4 节）。

式（14.41）所示的线性力关系是非平衡热力学的基础。如在方框 14.3 中所讨论的，这些关系式只有在接近平衡时才成立。因为许多胞内过程都在远离平衡态下进行，如糖酵解途径中的一些反应（见例 14.1），这就限制了这一方法的广泛应用。但是，即使该过程远离平衡，对各种细胞过程的经验分析表明在一个过程的力和流之间常常有线性关系存在。下面从一简单的可逆酶催化反应为例对为什么是这种情况[1] 作出可能的解释。反应系统为：

$$E+S \underset{k_{-1}^S}{\overset{k_1^S}{\longleftrightarrow}} ES \underset{k_2^P}{\overset{k_2^S}{\longleftrightarrow}} EP \underset{k_1^P}{\overset{k_{-1}^P}{\longleftrightarrow}} E+P \tag{14.53}$$

上述方程中，E 是酶，ES 和 EP 分别是酶-底物和酶-产物复合物。该反应的净正向速率 v 为：

$$v = \frac{v_{S,max}\dfrac{c_S}{K_S} - v_{P,max}\dfrac{c_P}{K_P}}{1+\dfrac{c_S}{K_S}+\dfrac{c_P}{K_P}} \tag{14.54}$$

式中，$v_{S,max}$是最大正向反应速率（在高底物浓度及 $c_P=0$ 时得到），$v_{P,max}$是最大逆向反应速率（在高产物浓度及 $c_S=0$ 时得到）。K_S，K_P 一般被称为 Michaelis-Menten 常数，它们由式（14.55）给出：

---

[1] 如下分析是受 Westerhoff and van Dam（1987）的工作所启发，他们的工作对这个问题给出了更深入的处理。

$$K_S=\frac{k_{-1}^S+k_2^S}{k_1^S};\quad K_P=\frac{k_{-1}^P+k_2^P}{k_1^P};\tag{14.55}$$

现在重写动力学方程（14.54）为反应亲和力的函数（等于化学势的变化）。由式（14.13）和式（14.14）可得：

$$e^{(\mu_S-\mu_P)/RT}=\frac{c_S}{c_P}\times\frac{c_{P,eq}}{c_{S,eq}}\tag{14.56}$$

此外，在平衡态下净反应速率为零，由此可得：

$$K_{eq}=\frac{c_{P,eq}}{c_{S,eq}}=\frac{K_P}{K_S}\times\frac{v_{S,max}}{v_{P,max}}\tag{14.57}$$

用这两个方程可将动力学方程重写为：

$$\frac{v}{v_{S,max}}=\frac{e^{(\mu_S-\mu_P)/RT}-1}{\left(\frac{K_S}{c_S+c_P}+1\right)e^{(\mu_S-\mu_P)/RT}+\frac{v_{S,max}}{v_{P,max}}\left(\frac{K_P}{c_S+c_P}+1\right)}\tag{14.58}$$

这一方程将净正向反应速率表示为反应亲和力（$A=\mu_S-\mu_P$）或推动力的函数。

直接应用式（14.58）受到如下事实的限制，即正向反应速率是底物和产物二者浓度的函数（或两个化合物的化学势）。但在实际应用中这两个变量常由它们的和的限定条件关联，即：

$$c_S+c_P=\text{常数}\tag{14.59}$$

该式使我们可以将净正向反应速率仅表示为反应亲和力的函数。图 14.10 给出了两组动力学参数下的结果。

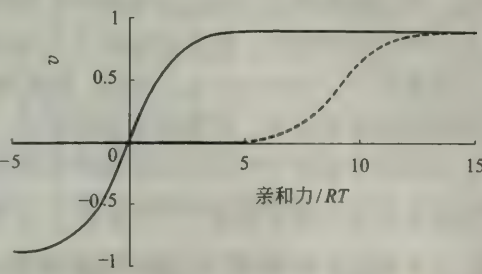


图 14.10　酶催化的反应速率对其自由能差（或反应亲和性）的依赖关系

假设底物和产物浓度的总和恒定(等于 1)，函数由式(14.58)计算得到。实线表示 $v_{S,max}=v_{P,max}=K_S=K_P$ 的热力学可逆反应(平衡常数 $K_{eq}=1$)。虚线表示 $v_{S,max}=K_S=10$，$v_{P,max}=0.1$，和 $K_P=100$ 的不可逆反应(平衡常数 $K_{eq}=1$)。亲和力为 $\mu_S-\mu_P$

常常要将反应区分为可逆的和不可逆的，但其与微观可逆性的原理相矛盾。按照这一原理，图 14.10 的两条曲线都应该经过原点，并且对于负的反应亲和力其净正向反应速率也应变为负。因此原则上说来两个反应都是可逆的，但当最大正向反应速率($v_{S,max}$)远大于最大逆向反应速率($v_{P,max}$)时，反应实际上是不可逆的，即只有在数值上非常大且为负的亲和力时反应才可逆向进行。对可逆反应(图 14.10 中的实线)可以看到在很宽的净正向反应速率范围内有如下关系成立：

$$v=LA\tag{14.60}$$

与之相反，对不可逆反应只有在很小的净正向反应速率范围内速率 v 和亲和力间的正比关系才成立（图 14.10 中的虚线）。对不可逆反应，在相关反应速率范围内（在 0.1 和 0.9 之间）式（14.60）是速率 v 和亲和力间关系的很差的近似。然而在大约速率 $v=0.5$ 时一个线性近似似乎是有可能的：

$$v=L^{\#}(A-A^{\#})\tag{14.61}$$

式中，$A^{\#}$是曲线折点处的反应亲和力；$L^{\#}$是曲线折点处的切线斜率。这两个参数是动力学参数的函数，Westerhoff and van Dam（1987）研究表明如果它们由下式给出：

$$L^{\#}=\frac{v_S+v_P}{4RT} \tag{14.62}$$

$$\frac{A^{\#}}{RT}=\ln\left(\frac{v_S}{v_P}\right)-2\frac{v_S-v_P}{v_S+v_P} \tag{14.63}$$

当速率 v 在0.18~0.93之间时，由式（14.61）计算出的净正向反应速率仅与真实值相差15%。v_S，v_P 由下式得到：

$$v_S=\frac{v_{S,\max}}{1+K_S/(c_S+c_P)};\ v_P=\frac{v_{P,\max}}{1+K_P/(c_S+c_P)} \tag{14.64}$$

自由能差与反应速率或跨膜通量间的线性关系已在许多系统中实验观测到，甚至于包括远离平衡进行的反应或过程（见 Westerhoff and van Dam，1987）。他们还分析了许多其它动力学方程并发现在所有情况下在一定自由能差范围内线性关系都可假定成立。

既然在远离平衡态下力流之间的线性关系仍成立，我们有兴趣知道在这种条件下表观系数间的倒数关系是否成立。在例14.6中已经提到 Stucki（1980）已经实验观测到了在远离平衡条件下进行的氧化磷酸化的倒数关系。此外 Caplan（1981）研究表明对高度耦合的酶反应，在多维折点附近进行反应不仅导致力流之间为线性关系，而且倒数关系也成立(Pietrobon and Caplan，1985)。但是，这是否是一般情况仍需要证明。因此人们应当只能在有足够实验证据的条件下假定倒数关系成立。

上述分析中的一个假定就是底物和产物浓度之和为常数。对某些途径反应这一假定并不合理，但很多数情况下对这些浓度都有物理约束。时常，可通过外部控制或严密的胞内调控使某一浓度保持恒定，或者其浓度大大超过作用于这些物质的酶的 Michaelis-Menten 常数。在这些情况下，Rottenberg（1973）研究表明反应速率和驱动力之间的关系接近线性。这清楚地表明对简单情况，产物浓度保持恒定。在这种情况下，推动力可以写为 $\ln(c_S)$的线性函数。因此反应速率也可以写为底物浓度的对数的线性函数。如图14.9所示，这样的关系与酶动力学研究中经常遇到的饱和形式动力学非常吻合。

14.4 热动力学在代谢控制分析中的应用

在第11章中已经全面介绍了代谢控制这一主题。其中介绍了通量控制系数（FCC）的概念，该系数可以定量地度量在整个途径通量中由某一单个反应或一组反应所施加的控制程度（第12章）。还表明 FCCs 可以通过代谢控制分析的加和原理和连接原理由特定反应速率的动力学模型分析得到［式（11.6)、式（11.14)、式（11.27)］。在这些分析中，弹性系数［式（11.11)］由于其体现了实际的酶动力学而尤为重要。在该章中还指出由于缺乏可靠的胞内动力学模型而阻碍了 FCCs 的直接推导及代谢途径的控制分析。

非平衡热力学的目标之一就是根据适当的驱动力推导出描述某一过程速度的表达式［式(14.41)］。原则上说这些速度表达式可被用来计算弹性系数并由其计算通量控制系数。在这一节，我们以一个青霉素生物合成过程❶ 为例来说明计算的一般过程。

考虑一个简单的两步途径，X_1 经过 X_2 转化为 X_3，其计量关系如下：

$$\begin{aligned} g_{11}X_1+g_{12}X_2=0 \\ g_{12}X_2+g_{23}X_3=0 \end{aligned} \tag{14.65}$$

❶ 从反应速率的热力学描述获取 MCA 参数是由 Nielsen（1997）给出的，现在介绍的是由这篇论文改写的。

这个途径可能是两个实际的酶反应，或者是多个酶反应结合为两个总反应。第 i 个反应的亲和力由下式给出：

$$A_i = -\Delta G_i^{0\prime} - RT\ln\left(\prod_{k=1}^{3} X_k^{g_{ik}}\right);\ i = 1,2 \tag{14.66}$$

式中，$\Delta G_i^{0\prime}$ 是第 i 个反应的标准自由能变化。进一步假定可以根据相应反应亲和力通过式（14.61）描述每个反应的速度。应用这一反应动力学的热动力学（thermokinetics）描述，相对于中间代谢物 X_2 的两个反应的弹性系数如下式：

$$\varepsilon_{2,i} = \frac{1}{v_i} \times \frac{\partial v_i}{\partial \ln(X_2)} = \frac{1}{v_i} \times \frac{\partial v_i}{\partial A_i} \times \frac{\partial A_i}{\partial \ln(X_2)};\quad i = 1,2 \tag{14.67}$$

其中两个偏导数可通过式（14.61）和式（14.66）得到：

$$\varepsilon_{2,i} = -\frac{g_{i2}RT}{A_i - A_i^{\#}};\quad i = 1,2 \tag{14.68}$$

因此，如果 A_i 和 $A_i^{\#}$ 已知，就可以计算两个反应的弹性系数了。对可逆反应，$A_i^{\#}$ 为零，可由式（14.68）从亲和力直接计算弹性系数，而亲和力可以通过式（14.66）由稳态下代谢物浓度计算得到。Westerhoff et al（1984）对平衡态下的酶动力学弹性系数的计算推导出了类似的关系式，但他们应用了质量作用比而不是反应亲和力来描述速率。为了促进对途径的通量控制，一般至少有一步反应是不可逆的，即在远离平衡态下进行。对这个反应参数 $A_i^{\#}$ 不是零，但可以通过将反应速率对反应亲和力作图得出其值。$A_i^{\#}$ 只决定于 Michaelis-Menten 常数，最大正向与逆向反应速率之比及 $c_S + c_P$［即其与酶的体内（*in vivo*）活性无关，见式（14.63）和式（14.64）］，因此原则上说 $A_i^{\#}$ 可以通过体外（*in vitro*）实验确定。但保证酶活性恒定是很重要的，否则 $L^{\#}$ 就会变化［见式（14.62）］，v 和 $A^{\#}$ 间的线性关系不再满足。在酶活性变化的情况下可以将反应速率对酶活性进行归一化，因为 $L^{\#}$ 与酶活（或 v_{max}）成正比（见例 14.8）。

在由式（14.68）计算出弹性系数后，可通过 11.1 节和 11.2 节中介绍的加和原理及连接原理确定通量控制系数。由此，反应速率的热动力学描述使我们可以由稳态下测得的代谢物浓度进行 MAC 系数的完整的求取。

式（14.68）还可应用于多于两个反应的代谢途径的分析，但这严格要求途径中没有跨越多于一个反应的调节回路，比如说当最后一个代谢物反馈抑制多步反应途径的第一个反应时就不能应用。这是因为这种热动力学速率分析只能描述底物和产物对反应速率的影响而不能描述效应物对速率的影响。要考虑的另外一点是反应集成的后果。许多途径都只包括一个或两个不可逆反应，而其它反应都接近于平衡。在这种情况下，反应可以集成为两个总反应以产生一个如式（14.65）所描述的途径结构，其中反应亲和力针对总反应而被确定。因为对所有接近平衡态的反应其 $A_i^{\#}$ 为零，集成反应的 $A_i^{\#}$ 值就等于相应不可逆反应的值，其不为零。类似地，对 FCCs 当平衡反应与一不可逆反应集成在一起时，集成反应的总 FCC 值也近似于该不可逆反应的值。

在不能将单个的途径中的反应集成为两个总反应以及调控回路超越单个反应时，上述方法不能直接应用。但此时仍可能应用热动力学表达式修正 Delgado-Liao 的方法以直接确定 FCCs（见 11.23 节和方框 11.4）。为此，将式（14.66）引入式（14.61）中得到下式：

$$v_i = a_i \sum_{j=1}^{L+1} k_{ij} \ln(X_j) + b_i \tag{14.69}$$

方框 14.4　Delgado 和 Liao 法的扩展

Delgado 和 Liao 法的出发点是式（1）：

$$\sum_{i=1}^{L} C_i \Delta v_i = 0 \tag{1}$$

其中，$\Delta v_i = v_i - v_{ss}$是第 i 个反应在瞬态过程的反应速率与稳态反应速率 v_{ss}相比较的变化。这个式子从连接定理推导出的假定是线性动力学。下面证明当动力学由式（14.69）表示时式（1）也成立。首先求弹性系数：

$$\varepsilon_{j,i} = \frac{b_i k_{ij}}{v_{ss}} \tag{2}$$

其中，v_{ss}是通过途径的稳态通量。当将式（2）代入连接定理式中，得到：

$$\sum_{i=1}^{L} C_i b_i k_{ij} = 0 \tag{3}$$

式(3)由 $\Delta\ln(X_j) = \ln[X_j(t_2)] - \ln[X_j(t_1)]$来乘，则得：

$$\sum_{i=1}^{L} C_i b_i k_{ij} \Delta\ln(X_j) = 0 \tag{4}$$

对于所有的 j，上式加和后得：

$$\sum_{j=2}^{L}\sum_{i=1}^{L} C_i b_i k_{ij} \Delta\ln(X_j) = \sum_{i=1}^{L} C_i b_i \sum_{j=2}^{L} k_{ij} \Delta\ln(X_j) = 0 \tag{5}$$

该式便可以简化为式（1），因为从式（14.61），有：

$$\Delta v_i = b_i \sum_{j=2}^{L} k_{ij} \Delta\ln(X_j) = 0 \tag{6}$$

就如 11.2.3 节所述，该方法使得可以通过测量瞬态过程中的代谢物浓度来直接得到 FCCs。在式（14.69）中 a_i，b_i 和k_{ij}是动力学参数。对于底物和产物，k_{ij}和计量系数是一样的，然而对效应物它们是经验参数。对于不影响其动力学的化合物（底物、产物和效应物），k_{ij}为零。对于没有效应物的简单情况，a_i 就等于$L_i^{\#}$，b_i 等于$-L_i^{\#}A_i^{\#}$，而一般情况下，它们应该作为经验参数考虑。基于 14.3 节的讨论，式（14.69）与 Delgado 和 Liao（1992）所假定的线性动力学相比是对反应动力学更好的近似，这使得它们可以更广泛地应用于 FCC 的确定。

【例 14.8】　应用热动力学方法对青霉素生物合成途径进行代谢控制分析

前面的方法是通过青霉素生物合成途径的弹性系数和 FCCs 的计算来阐述的。它也曾在例 11.1 中应用动力学模型加以分析过。在该例中提到了通量控制主要是由途径的头两个步骤所施加的，因此下面只考虑这两个步骤。Pissarra 和 Nielsen（1997）已经计算了这些反应

的自由能变化。两个反应都是强放热的，ACVS 催化反应的自由能变化为 $-130kJ \cdot mol^{-1}$，而 IPNS-催化反应为 $-689kJ \cdot mol^{-1}$。因此这两个反应都在远离平衡态下进行。

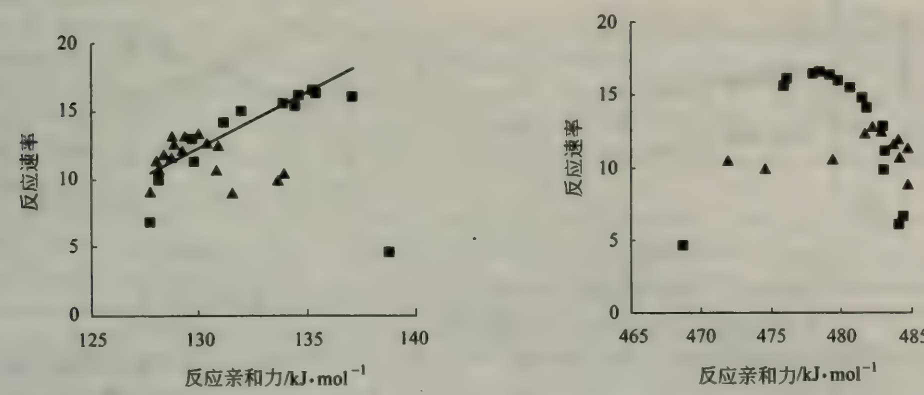


图 14.11　青霉素生物合成最初两步的反应速率[$\mu mol \cdot g^{-1}$(干重)$\cdot h^{-1}$]与反应亲和力（$kJ \cdot mol^{-1}$）的关系

数据来自两种菌的流加培养，因此稍有不同。▲ 流加培养 FB023 的数据；■ 流加培养 FB028 的数据。化学亲和力的计算依据 Pissara 和 Nielsen（1997）的方法，数据引自 Jφrgensen 等（1995a，b）。

(a) ACVS 催化的反应速率和反应亲和力；(b) IPNS 催化的反应速率和反应亲和力

利用流加培养数据可计算出第一个反应的自由能变化和亲和力。将 ACVS-催化反应的速率（其在流加培养过程中是变化的）对计算的反应亲和力作图得到一线性关系［见图 14.11 (a)]。此外还发现 ACVS 的活性近似为常数（Nielsen and Jorgensen，1995），因此可以确定热动力学式（14.61）中的参数。$L^{\#}$ 值计算为 $0.82 \times 10^{-6} mol^2 \cdot g^{-1}$(干重)$\cdot h^{-1} \cdot kJ^{-1}$，$A^{\#}$ 为 $115kJ \cdot mol^{-1}$。

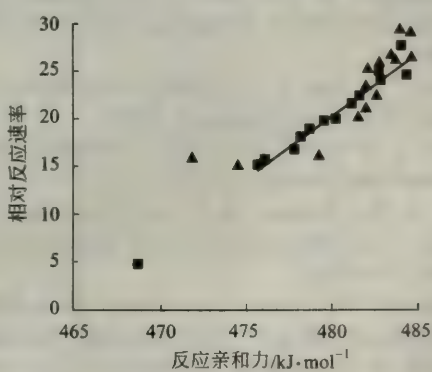


图 14.12　IPNS 催化的相对反应速率(反应速率比酶活)与反应亲和力的关系

反应速率的数据来自 Nielsen 和 Jφrgensen(1995)

对于 IPNS-催化反应，不但反应速率和反应亲和力观察不到线性关系［见图 14.11 (b)]，而且事实上随着反应亲和力的增加反应速度反而降低。这可以理解为流加培养过程中相应酶活性降低的结果（Nielsen and Jorgensen，1995）。这种情况下不能直接应用热动力学式（14.61）。然而如前面已经讨论的，如果将反应速度对测量的酶的活性进行归一化，在相对反应速率和反应亲和力之间就可以得到线性关系（见图 14.12），进而计算得到 $A^{\#}$ 等于 $465kJ \cdot mol^{-1}$。

利用求得的热动力学表达式中的参数，可以计算流加培养不同时间时的弹性系数和 FCCs。严格地说，只有在稳态下可以应用加和原理和连接原理，而上述的流加培养过程并不适用。不过，正如 Pissarra，et al（1996）所论述的，生物合成途径可假定为处于拟稳态。对一个流加培养的计算结果见图 14.13。可以看出在培养过程中通量控制有一个从第一个反应到第二个反应的变换，这和例 11.1 中该途径的动力学分析结果是一致的。

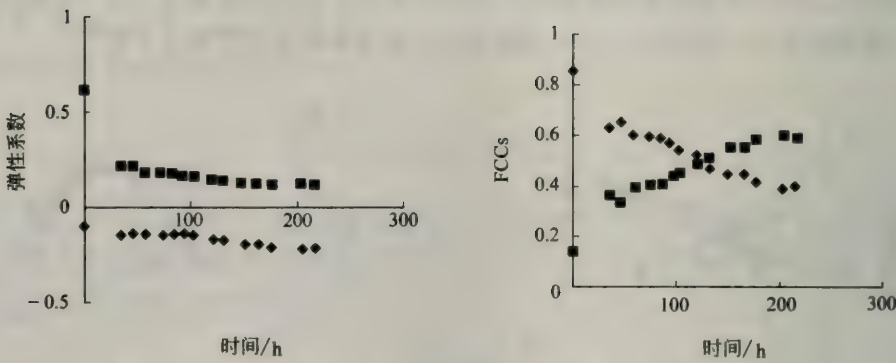


图 14.13 基于青霉素生物合成最初两步反应热力学描述的 MCA

在不同的流加培养时间计算弹性系数和 FCCs[FB028Jφrgensen et al(1995b)]

(a)ACVS 的弹性系数(◆);IPNS 的弹性系数(■)。弹性系数是在已给时间的自由能变化通过用式(14.68),并取 $A^{\#}_{ACVS}=115\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$,$A^{\#}_{IPNS}=465\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$而计算出的。(b)ACVS 的 FCCs(◆);IPNS 的 FCCs(■)。FCCs 是从弹性系数用加和定理和连接定理而计算出的

参 考 文 献

Caplan, S. R. (1971). Nonequilibrium thermodynamics and its application to bioenergetics. *Current Topics in Bioenergetics* **4**, 1-79.

Caplan, S. R. (1981). Reciprocity or near-reciprocity of highly coupled enzymatic processes at the multidimensional inflection point. *Proceedings of the National Academy of Science. USA* **78**, 4314-4318.

Christensen, L. H., Henriksen, C. M., Nielsen, J., Villadsen, J. & Egel-Mitani, M. (1995). Continuous cultivation of *Penicillium chrysogenum*. Growth on glucose and penicillin production. *Journal of Biotechnology* **42**, 95-107.

Delgado, J. & Liao, J. C. (1991). Identifying rate-controlling enzymes in metabolite pathways without kinetic parameters. *Biotechnology Progress* **7**, 15-20.

Delgado, J. & Liao, J. C. (1992). Metabolic Control analysis from transient metabolite concentrations. *Biochemical Journal* **282**, 919-927.

Groen, A. K., Wanders, R. J. A., Westerhoff, H. V., van der Meer, R. & Tager, J. M. (1982). Quantification of the contribution of various steps to the control of mitochondrial respiration. *Journal of Biological Chemistry* **257**, 2754-2757.

Jφrgensen, H. S., Nielsen, J., Villadsen, J. & Mφllgaard, H. (1995a). Metabolic flux distributions in *Penicillium chrysogenum* during fed-batch cultivations. *Biotechnology and Bioengineering*. **46**, 117-131.

Jφrgensen, H. S., Nielsen, J., Villadsen, J. & Mφllgaard, H. (1995b). Analysis of the penicillin V biosynthesis during fed-batch cultivations with a high yielding strain. *Applied Microbiology Biotechnology* **43**, 123-130.

Kedem, O. & Caplan, S. R. (1965). Degree of coupling and its relation to efficiency of energy conversion. *Transactions of the Faraday Society* **6**, 1897-1911.

Lehninger, A. E. (1975). *Biochemistry*, 2nd ed. New York: Worth.

Lemasters, J. J. & Billica, W. H. (1981). Non-equilibrium thermodynamics of oxidative phosphorylation by inverted inner membrane vesicles of rat liver mitochondria. *Journal of Biological Chemistry*. **256**, 12949-12957.

Lemasters, J. J., Grunwald, R. & Emaus, R. K. (1984). Thermodynamic limits to the ATP/site stoichiometries of oxidative phosphorylation by rat liver mitochondria. *Journal of Biological Chemistry* **259**, 3058-3063.

Mavrovouniotis, M. L. (1990). Group contributions for estimating standard Gibbs energies of formation of biochemical compounds in aqueous solutions. *Biotechnology and Bioengineering* **36**, 1070-1082.

Mavrovouniotis, M. L. (1991). Estimation of standard Gibbs energy changes of biotransformations. *Journal Biological Chemistry* **266**, 1440-1445.

Mavrovouniotis, M. L. (1993). Identification of localised and distributed bottlenecks in metabolic pathways. International Conference on Intelligent Systems for Molecular Biology, Washington DC.

Mitchell, P. (1961). Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transfer by a chemiosomotic type of mechanism. *Nature* **191**, 144-148.

Nielsen, J. (1997). Metabolic control analysis of biochemical pathways based on a thermokinetic description of reaction rates. *Biochemical Journal* **321**, 133-138.

Nielsen, J. & Jϕrgensen, H. S. 1995. Metabolic control analysis of the penicillin biosynthetic pathway in a high yielding strain of *Penicillium chrysogenum*. *Biotechnology Progress* **11**, 299-305.

Onsager, L. (1931). Reciprocal relations in irreversible processes. *Physical Reviews* **37**, 405-426.

Pietrobon, D. & Caplan, S. R. (1985). Flow-force relationships for a six-state proton pump model: Intrinsic uncoupling, kinetic equivalance of input and output forces, and domain of approximate linearity. *Biochemistry* **24**, 5764-5776.

Pissarra, P. N. & Nielsen, J. (1997). Thermodynamics of metabolic pathways for penicillin production: Analysis of thermodynamic feasibility and free energy changes during fed-batch cultivation. *Biotechnology Progress*. **13**, 156-165.

Pissarra, P. N., Nielsen, J. & Bazin, M. J. (1996). Pathway kinetics and metabolic control analysis of a high-yielding strain of *Penicillium chrysogenum* during fed-batch cultivations. *Biotechnology and Bioengineering* **51**, 168-176.

Roels, J. A. (1983). Energetics and Kinetics in Biotechnology. Amsterdam: Elsevier Biomedical Press.

Rottenberg, H. (1973). The thermodynamic description of enzyme-catalyzed reactions. The linear relation between the reaction rate and the affinity. *Biophysical Journal* **13**, 503-511.

Rottenberg, H. (1979). Non-equilibrium thermodynamics of energy conversion in bioenergetics. *Biochimica et Biophysica Acta* **549**, 225-253.

Senior, A. E. (1988). ATP synthesis by oxidative phosphorylation. *Phys. Rev.* **68**, 177-231.

Stucki, J. W. (1980). The optimal efficiency and the economic degrees of coupling of oxidative phosphorylation. *European Journal of Biochemistry* **109**, 269-283.

Westerhoff, H. V. & van Dam, K. (1987). Thermodynamics and Control of Biological Freeenergy Transduction. Amsterdam: Elsevier

Westerhoff, H. V., Groen, A. K. & Wanders, R. J. A.(1984). Modern theories of metabolic control and their applications. *Bioscience Reports* **4**, 1-22

专 业 词 汇

腺嘌呤　Adenine(A)　一种含氮碱基，在DNA双螺旋结构中与胸腺嘧啶配对(A-T)。

等位基因　Alleles　一个基因座的不同形式；二倍体细胞每个基因座的两个等位基因分别遗传自双亲的每一方(例如：决定眼睛颜色的基因座的等位基因可使眼睛成为蓝色或棕色)。

变构的　Allosteric　描述一类蛋白质尤其是酶的术语，某种化合物能够与这类蛋白质活性位点之外的某个位点结合，引起活性位点的构象发生改变，以致于正常底物不能与之结合。变构特性在酶活性调控过程中起作用。

氨基酸　Amino acid　一类构成蛋白质的分子，有20种。构成蛋白质的氨基酸种类和序列亦即蛋白质的功能由遗传密码决定。

扩增　Amplification　一段特定DNA片断拷贝数的增加；能够在体内或体外进行。见克隆、聚合酶链式反应。

合成代谢　Anabolism　指由较简单的分子［如有机和(或)无机前体物］合成细胞组分的代谢过程。合成代谢过程通常需要能量。

厌氧呼吸　Anaerobic respiration　发生在无氧条件下的呼吸作用。由CO_2、Fe^{2+}、延胡索酸、硝酸盐、亚硝酸盐、一氧化二氮、硫、硫酸盐分子等代替常规呼吸作用中的氧分子作为终端电子受体。需要指出的是，与发酵过程不同，厌氧呼吸仍然用电子传递链转运电子。

反密码子　Anticodon　与mRNA上密码子配对的tRNA上的三个连续的碱基序列。

抗原　Antigen　一种可以引起免疫应答的物质，通常是大分子。

碱基对　Base pair(bp)　通过弱键结合在一起的两个含氮碱基(腺嘌呤和胸腺嘧啶，或鸟嘌呤和胞嘧啶)。DNA的两条链通过碱基对之间的键结合成为双螺旋结构。

碱基顺序　Base sequence　DNA分子中核苷酸顺序。

生物技术　Biotechnology　由基础研究发展起来的，目前应用于科学研究和产品开发的一系列生物学技术，尤其指应用于工业的重组DNA技术、细胞融合技术和新的生物加工技术。

衣壳　Capsid　病毒的蛋白质外壳。

分解代谢　Catabolism　分解有机化合物的生物化学过程，通常导致能量产生。

细胞微生物学　Cellular microbiology　一门新兴的介于细胞生物学和微生物学之间的学科。这一新领域的主要研究焦点之一是病源细菌对众多真核细胞功能的干扰，比如：胞内区室的成熟，细胞内通讯，甚至细胞分裂和分化。从这个意义上讲，细胞微生物学的研究为哺乳动物细胞生物学家提供了先进的研究手段［(1996)，Science 271，135］。

陪伴蛋白　Chaperonin　一种能够帮助其它蛋白正确折叠和多亚基结构装配的蛋白质。

化学渗透　Chemiosmosis　利用离子跨膜梯度尤其是质子梯度产生ATP的作用。见质子动力。

染色体　Chromosome　携带有细胞代谢所必需的基因的遗传物质。原核细胞具有典型

的由环状DNA分子组成的单一染色体。真核细胞含有多条染色体，每一条染色体都含有一条与特定蛋白质结合的线性DNA分子。

克隆　Clones　源于单一祖先的一群细胞。

克隆　Cloning　由单一祖先通过无性方式，产生遗传上完全相同的一群细胞的过程。在重组DNA技术中，使用DNA操作方法产生多拷贝的单个基因或DNA片断被称为DNA克隆。

克隆(用)载体　Cloning vector　源于病毒、质粒或高等生物细胞，具有自我复制能力的环状DNA分子。适当大小的DNA片段能够被整合到克隆载体上而载体不会失去自我复制能力；载体将外源DNA导入宿主细胞并可以在宿主中大量复制。质粒、黏粒(大的质粒)和酵母人工染色体都是克隆载体的例子；克隆载体常常是包含几种来源的DNA序列的重组分子。

辅酶　Coenzyme　通过接受和供给电子或功能集团而参与酶反应的低分子量化学物质。例如：NAD^+，FAD。

大宗化学品　Commodity chemical　商品价值低而且大宗销售的化学品，例如乙醇。

互补DNA　Complementary DNA(cDNA)　由信使RNA为模板合成的DNA，单链的形式通常在做物理图谱时作为探针使用。

保守序列　Conserved sequence　DNA分子的一段碱基序列(或蛋白质的一段氨基酸序列)，它在整个进化过程中实质上保持不变。

黏粒　Cosmid　人工构建的含有λ噬菌体的*cos*基因的克隆载体。黏粒能够被包裹在λ噬菌体内去感染大肠杆菌，从而可以克隆不能用质粒来克隆转化细菌宿主的大片断DNA。

胞嘧啶　Cytosine(C)　一种含氮碱基，在DNA双螺旋结构中与鸟嘌呤配对(G-C)。

二倍体　Diploid　一套完整的遗传物质由成对的染色体组成，每套染色体分别来自两个亲本之一。除了配子外，大部分动物细胞具有一套双倍体染色体。双倍体的人类基因组含有46条染色体。与单倍体比较。

脱氧核糖核酸　DNA(deoxyribonucleic acid)　编码遗传信息的分子。DNA是由核苷酸碱基对之间的弱键相连形成的双链分子。DNA中的四种核苷酸包括腺嘌呤(A)、鸟嘌呤(G)、胞嘧啶(C)和胸腺嘧啶(T)。事实上，碱基对仅在A与T及G与C之间形成，这样每一条单链的碱基序列可以从与其配对的另一条链的碱基序列推断出来。

DNA复制　DNA replication　以已有的DNA为模板合成新的DNA链。在人类和其它真核生物中，DNA复制发生在细胞核中。

DNA序列　DNA sequence　一段DNA片断、一个基因、一条染色体或一个完整基因组中碱基对的相对顺序。

电子受体　Electron acceptor　在氧化还原反应中接受电子的物质。电子受体是氧化剂。

电子传递磷酸化　Electron transport phosphorylation　涉及与膜相关的电子传递链和质子动力生成的ATP的合成。也称为氧化磷酸化。

电泳　Electrophoresis　大分子混合物(例如DNA片断和蛋白质)的一种分离方法。电流通过含有这类混合物的介质时，每一种分子由于其所带电荷以及大小的差异而以不同的速率穿过该介质。分离就是基于这些差异。琼脂糖凝胶和聚丙烯酰胺凝胶是蛋白质和核酸电泳常用的介质。

EMP 途径　Embden-Meyerhof-Parnas pathway　EMP 途径是将葡萄糖降解为丙酮酸的途径。这个途径的 6 碳阶段将葡萄糖转变为 1,6-二磷酸果糖；在 3 碳阶段，三磷酸甘油醛转化成丙酮酸时产生 ATP(与恩特纳-道德洛夫途径比较)。

恩特纳-道德洛夫途径(ED 途径)　**Entner-Doudoroff pathway** (ED pathway)　该途径转化葡萄糖为丙酮酸和通过产生 6-磷酸葡萄糖酸并进行脱水而生成三磷酸甘油醛。

酶　Enzyme　起催化作用的蛋白质，它加快生物化学反应进行的速率，但不改变反应的方向和性质。

大肠杆菌　Escherichia coli　是普通杆菌。由于没有致病性而且很容易在实验室里培养，所以遗传学家对它进行了深入细致的研究。

真核生物　Eukaryote　这类生物的细胞有如下特征：(1)染色体具有核小体结构并且由双层膜与细胞质隔开；(2)在细胞质中不同的细胞器内将功能区室化。

外源 DNA　Exogenous DNA　来源于一种生物之外的 DNA。

外显子　Exons　基因内编码蛋白质的 DNA 序列。与内含子比较。

表达　Expression　在细胞内基因通过基因产物的形成而行使功能的能力。

表达载体　Expression vector　含有必要的调控序列以允许克隆的基因转录和翻译的一种克隆载体。

反馈抑制　Feedback inhibition　终端产物对其生物合成途径的抑制作用。

发酵　Fermentation　(1)产生 ATP 的分解代谢反应，反应中有机化合物既可以作为初期的电子供体也可作为最终的电子受体；(2)大规模的微生物工艺过程。

融合蛋白　Fusion protein　两种或多种基因以保持有其正确的可读框架的形式连接后的翻译结果，产物是单一蛋白质。

凝胶　Gel　一种惰性聚合物，通常由琼脂糖和聚丙烯酰胺组制成，用于电泳分离核酸或蛋白质类大分子。

基因　Gene　遗传的基本物理和功能单位。基因是一段位于特定染色体上特定位点的有序核苷酸序列，编码一个具有特定功能的产物(即：蛋白质或 RNA 分子)。见基因表达。

基因破坏　Gene disruption　通过体内和体外重组，以容易选择的突变基因来取代野生型基因。

基因表达　Gene expression　基因表达是基因的编码信息被转换成细胞内结构并行使功能的过程。表达的基因包括被转录成 mRNA 然后被翻译成蛋白质的基因，以及被转录成 RNA 但不被翻译成蛋白质的基因(如：转移 RNAs 和核糖体 RNAs)。

基因作图　Gene mapping　DNA 分子(染色体或质粒)中基因的相对位置和它们之间的距离(以连锁单位或物理单位)的确定。

基因产物　Gene product　由基因表达所产生的生物化学物质——RNA 或蛋白质。基因产物的量用以计量基因活性的高低。异常量的基因产物可能与致病的等位基因相关联。

遗传密码　Genetic code　mRNA 上以三联体(密码子)形式编码的，在蛋白质合成中决定氨基酸序列的核苷酸的序列。一个基因的 DNA 序列能用于预测 mRNA 序列，而遗传密码进而可用来预测氨基酸的顺序。

遗传工程　Genetic engineering　在 DNA 分离、操作、重组和表达中体外技术的运用。

遗传图　Genetic map　染色体上基因的连锁图谱。

基因组文库　Genomic library　由代表一个生物体完整基因组的一系列随机产生的交

叠 DNA 片断组成的克隆的集合。

生长因子　Growth factor　在生物体生长的营养物中必须提供的有机化合物，因为它们是细胞的必须组分或是这些组分的前体物，而且不能由生物体自己合成。

鸟嘌呤　Guanine　一种含氮碱基，在 DNA 双螺旋结构中与胞嘧啶配对(G-C)。

单倍体　Haploid　一套完整的遗传物质由单套染色体组成(二倍体生物全套遗传物质的一半)，存在于动物的卵细胞和精细胞、植物的卵细胞和花粉以及大多数微生物细胞中。人类的生殖细胞中有 23 条染色体。

同源性　Homologies　相同物种或不同物种的个体之间 DNA 或蛋白质序列的相似性。

人类基因治疗　Human gene therapy　直接在细胞中引入正常 DNA 以校正遗传缺陷。

人类基因组计划的启动　Human Genome Initiative　1986 年，始于美国能源部的几个研究项目的统称，目标是：(1)在已知的染色体位置创建出一组有序的 DNA 片断；(2)开发新的计算方法分析遗传图谱和 DNA 序列数据；(3)发展新的技术和仪器，检测和分析 DNA。由美国能源部(DOE)发起的这个项目现在称作人类基因组项目。由美国能源部和国家卫生研究院(NIH)领导的这个国家研究计划称为人类基因组计划。

杂交　Hybridization　两条互补的 DNA 链或一条 DNA 链与一条 RNA 链结合以形成双链分子的过程。

免疫应答(反应)　**Immune response**　由于接触外源物质而在人类或动物体内诱导产生的特异性反应。这种引起免疫应答的外源物质称为免疫原或抗原。免疫应答包括抗体的产生或者 T-细胞的激活，二者也可同时发生。

原位杂交　*In situ* hybridization　在克隆的细菌或培养的真核细胞中利用 DNA 或 RNA 探针检测互补 DNA 序列的存在。

体外　*In vitro*　字面意思为：在器皿内，离开生物机体。与“体内(*in vivo*)”一词相反，用于描述在试管中或其它器皿中发生的任何过程。如果研究或试验是在生物体以外，也就是在试管中进行，即被称为是在“体外”进行的。

体内 *In vivo*　在体内，在生物机体内，与“体外”一词相反。在生物机体内进行的研究或试验被称为是在“体内”进行的。

信息学　Informatics　研究计算机和统计学技术在信息处理中的应用的学科。在基因组计划中，信息学包括开发快速搜索数据库、分析 DNA 序列信息以及从 DNA 序列数据预测蛋白质序列和结构等方面的方法。

起始因子　Initiation factors(IF)　除 mRNA 和核糖体以外的一组蛋白质合成起始所必须的具有催化活性的蛋白质。在细菌中，三种不同的蛋白质已被确认，IF-1(8kDa)，IF-2(75kDa)和 IF-3 (30kDa)。在真核生物中，至少 6～8 种蛋白质已被确认。IF-1 和 IF-2 增强起始 tRNA 与起始复合物的结合。

内含子　Introns　阻断基因上蛋白质编码序列的 DNA 碱基序列；这些序列被转录成 RNA，但是在 RNA 被翻译成蛋白质之前这些序列被剪切掉。

千碱基　Kilobase(kb)　DNA 片段的长度单位，等于 1000 个核苷酸。

乳糖阻遏物　Lactose repressor　通常以非常高的亲和力结合到乳糖操纵子的操纵区域的一种蛋白质(37kDa 亚基的四聚体)，通过阻断 RNA 聚合酶进入启动子区而抑制下游基因的转录。当乳糖阻遏物结合异乳糖时，它与操纵基因的结合减弱，因而基因被解除阻遏。

库　Library　无序克隆(即从特定生物体克隆的 DNA)的集合，它们之间的相互关系可

以通过绘制物理图谱来建立。

基因座　Locus（复数为 loci）　基因或其它染色体标记物在染色体上的位置以及这一位置上的 DNA。一些情况下"基因座"这一术语的运用仅限于表达的 DNA 区段。

标记　Marker　染色体上可识别的物理位置(如：限制性内切酶位点，基因)，它们的遗传可以被追踪。标记可以是表达的 DNA 区段(基因)或一些编码功能未知，但是遗传方式能够被确定的 DNA 片段。

信使 RNA　Messenger RNA（mRNA）　RNA 的一种，含有指定蛋白质的氨基酸序列并且在核糖体上进行翻译的信息。在真核生物中，mRNA 通常通过剪接大的初级转录物而形成。真核生物的 mRNA 带有一个 GTP(鸟苷三磷酸)帽和一个聚腺苷酸(polyA)尾。

代谢　Metabolism　细胞中的所有生物化学反应，包括合成代谢和分解代谢。

微生物　Microorganism　小得不能用肉眼看见的生物体，包括细菌、真菌、原生动物和微藻，也包括病毒。

线粒体　Mitochondrion（复数为 mitochondria）　负责呼吸和电子传递磷酸化过程的真核细胞器。

突变　Mutation　生物体 DNA 碱基序列可遗传的改变。无义突变：将有义密码子变成不能编码氨基酸的无义碱基序列的突变。琥珀突变：由于在基因的编码序列内引入终止密码(TAA，TAG，TGA)而导致翻译提前终止的突变。

(磷酸)烟酰胺腺嘌呤二核苷酸　Nicotinamide adenine dinucleotide（phosphate）[NAD(p)]　一种重要的辅酶，在广泛的氧化还原反应中起氢的载体作用；H 被携带在烟酰胺的残基上。该辅酶的氧化形式被写成 $NNA(P)^+$，还原形为 NAD(P)H。许多氧化还原酶是 NAD^+ 或 NAD^+ 专一性的，虽然一些氧化还原酶能与二者都起作用。作为相当普遍的法则，NADP 多与生物合成反应相关，NAD^+ 则更常与分解代谢和产能反应相关。

核苷酸　Nucleotide　由含氮碱基(在 DNA 中是腺嘌呤、鸟嘌呤、胸腺嘧啶或胞嘧啶，在 RNA 中是腺嘌呤、鸟嘌呤、尿嘧啶或胞嘧啶)，一个磷酸分子和一个糖分子(在 DNA 中是脱氧核糖，在 RNA 中是核糖)组成的 DNA 或 RNA 的亚单位。成千成万个核苷酸连接在一起构成 DNA 或 RNA 分子。

细胞核　Nucleus　真核生物中含有遗传物质的细胞器。

寡核苷酸　Oligonucleotide　一段短的核酸分子，既可从生物体中也可通过化学合成获得。

癌基因　Oncogene　其一种或多种形式与癌相关的基因。许多癌基因直接或间接地参与细胞生长速率的调控。

可读框 Open reading frame（ORF）　开始于起始密码子结束于终止密码子一个 DNA 分子的全长。

操纵基因　Operator　DNA 分子上阻遏物的结合位点，是操纵子的一部分。

操纵子　Operon　由共同转录的若干结构基因组成的可控制的转录单元。至少包括两个不同的区域：操纵基因区域和启动子区域。第一个被描述的操纵子的例子是 lac 操纵子。

氧化-还原反应　Oxidation-reduction（redox）**reaction**　一对耦联的化学反应，其中一个化合物被氧化，而另一个接受氧化反应中释放的电子而被还原。

周质间隙　Periplasmic space　革兰氏阴性菌细胞质膜与细胞壁之间的区域，含有某些与营养相关的酶。

噬菌体 Phage 以细菌细胞为天然宿主的病毒。

物理图谱 Physical map DNA 上可识别的界标位置图谱(如：限制酶的切割位点、基因)，不考虑遗传行为，用碱基对测定距离。人类基因组最低分辨率的物理图谱是 24 条染色体上的带状化模式；最高分辨率的物理图谱应是染色体的全部核苷酸序列。

质粒 Plasmid 可以自主复制的染色体外的环状 DNA 分子，不同于通常细菌的基因组，而且在非选择性条件下对细胞的生存是非必需的。一些质粒可以整合到宿主的基因组中，一些人工构建的质粒可以作为克隆载体。

多顺反子标 mRNA Polycistronic mRNA 由数个串连排列的基因转录而产生的单一 mRNA 分子；具有代表性的是由操纵子转录的 mRNA。

聚合酶链式反应 Polymerase chain reaction (PCR) 使用热稳定聚合酶，以两条短的单链 DNA 为引物在体外扩增 DNA 的方法。一条引物要与待扩增序列的正链的 3′端互补，另一条引物则与待扩增序列的负链的 3′端互补。由于新合成的 DNA 链在后续反应中可作为引物的追加模板，连续多轮的引物退火、链的延伸和变性使目的序列得以快速和高度特异性的扩增。PCR 也可用于检定 DNA 样品中特定序列的存在。

多肽 Polypeptide 由肽键连接到一起的几个氨基酸。

引物 Primer 聚合酶链式反应开始前已存在的多核苷酸短链，DNA 聚合酶可将新的脱氧核糖核苷酸加到该短链上。

探针 Probe 免疫或者放射标记的具有特定碱基序列的单链 DNA 或 RNA 分子，用于杂交以检测互补的碱基序列。

原核生物 Prokaryotes 一类生物体，即细菌和蓝细菌(以前称作蓝-绿藻)，其特征为具有一条或偶尔两条简单、裸露、通常为环状 DNA 的染色体，没有核膜并只具有少数种类的细胞器(通常只有质膜和核糖体)。

启动子 Promoter DNA 的一个区段，在启动 DNA 转录为 RNA 之前，RNA 聚合酶结合到该区段上。转录起始的核苷酸的位置被定为 +1，从这个位置开始对核苷酸进行编号：这个位置的上游为负，下游为正。大多数细菌启动子上有两个聚合酶结合所必须的共有序列。第一个是位于 −10 位置的普里布诺框，含共有序列 5′-TATAAT-3′。第二个是以 −35 为中心的负 35 序列，含共有序列 5′-TTGACA-3′。调节基因转录的大部分因子都是通过与启动子或与启动子相邻位点的结合来影响转录的起始。真核生物的启动子知道得很少；三种 RNA 聚合酶中的每一种作用于不同的启动子。RNA 聚合酶Ⅰ识别 rRNA 前体物转录的单一启动子。转录编码多肽的所有基因的 RNA 聚合酶Ⅱ识别成千上万个启动子。这些启动子中的大部分具有戈德堡-霍格内斯框或 TATA 框，它们集中在 −25 位置并具有共有序列 5′-TATAAAA-3′，而有些启动子在 −90 附近有共有序列为 5′-GGCCAATCT-3′的 CAAT 框。越来越多的证据显示，所有“持家”基因的启动子都具有多拷贝的、含 5′-GGGCGG-3′序列的 GC 丰富单元。聚合酶Ⅱ的转录也受更远端的称为增强子的元件的影响。RNA 聚合酶Ⅲ合成 5S 核糖体 RNA、全部 tRNA 和一些小的 RNA。RNA 聚合酶Ⅲ的启动子既可以像在编码 5SRNA 的基因上那样以单一序列存在，又可以像在所有的 tRNA 基因上那样以两个区段存在。

蛋白质 Protein 由一条或多条具有特定顺序的氨基酸链组成的大分子物质，它由编码蛋白质的基因中核苷酸的碱基序列所决定。生物体的细胞、组织和器官的结构、功能和调控都需要蛋白质，而且每种蛋白质有独特的功能。激素、酶及抗体都是蛋白质的例子。

质子动力　Proton-motive force（PMF）　通过电子传递链的作用由质子释放而产生的膜的赋能状态。

嘌呤　Purine　一种含氮的双环碱性化合物，存在于核酸中。DNA 和 RNA 中的腺嘌是腺嘌呤和鸟嘌呤。

嘧啶　Pyrimidine　一种含氮的单环碱性化合物，其存在于核酸中。DNA 中的嘧啶是胞嘧啶和胸腺嘧啶，RNA 中的嘧啶是胞嘧啶和尿嘧啶。

重组克隆　Recombinant clones　含有重组 DNA 分子的克隆。见重组 DNA 技术。

重组 DNA 分子　Recombinant DNA molecules　用重组 DNA 技术连接起来的不同来源的 DNA 分子的组合。

重组 DNA 技术　Recombinant DNA technologies　在无细胞体系中(细胞或生物体以外的环境)将 DNA 片断连接起来的过程。在适当的条件下，重组 DNA 分子能够进入细胞，在细胞内或进行自主复制或整合到细胞的染色体上去进行复制。

重组　Recombination　子代获得不同于亲代基因的基因组合过程。在高等生物中，这可通过遗传物质的交换来进行。

调控　Regulation　控制蛋白质合成速率的过程，诱导和阻遏均属于调控的例子。

调节区域或序列　Regulatory regions or sequences　控制基因表达的一段 DNA 碱基序列。

调节子　Regulon　两个或两个以上的空间上分开的、由共同的调节物分子以协调的方式调控的基因。

阻遏蛋白　Repressor protein　一种结合于操纵基因上阻止基因转录的蛋白质。阻遏蛋白与操纵基因结合的亲和力可受其它分子的影响。诱导物与阻遏蛋白结合削弱它们与操纵基因的结合能力，而辅阻遏物增加这种结合能力。阻遏蛋白的典型范例是乳糖阻遏蛋白，它作用于诱导物为 β-半乳糖苷(例如乳糖)的 lac 操纵子。它是一个由 360 个氨基酸组成的多肽，四聚体是它有活性的形式。

限制性酶切位点　Restriction enzyme cutting site　DNA 中一段特定的可以被限制性内切酶切割的核苷酸序列。有些切割点在 DNA 上频繁出现(如，每几百个碱基对就出现一次)，有些切割点出现的频率则很低(例如，每一万个碱基对才出现一次)。

限制性内切酶　Restriction enzyme，endonuclease　一种识别特定的、短的核苷酸序列并在这些位点切割 DNA 的蛋白质。细菌含 400 多种这样的酶，可识别和切割 100 种以上的不同的 DNA 序列。见限制性酶切位点。

核糖核酸　Ribonucleic acid（RNA）　存在于细胞核和细胞质中的一种化学物质，在蛋白质合成和细胞的其它化学活动中起重要作用。RNA 的结构类似于 DNA 的结构。RNA 分子有几类，包括信使 RNA、转移 RNA、核糖体 RNA 和其它小分子 RNA，每一种都用于不同的目的。

核糖体 RNA　Ribosomal RNA(rRNA)　在细胞的核糖体中发现的一类 RNA。

核糖体　Ribosome　由 rRNA 和核蛋白亚基组成的异二聚体多亚基酶。核糖体与 mRNA和氨酰 tRNA 相互作用，翻译信使 RNA 上编码蛋白质的序列。在所有的生物体中，包括叶绿体及线粒体中发现的核糖体很相似，都是由大、小两个亚基组成，然而原核生物和真核生物核糖体的差异是显而易见的。

SD 序列　Shine-Dalgarno sequence　在原核(生物)的 mRNA 分子翻译起始位点上游的

一段短的核苷酸序列，其作用是结合核糖体 RNA 并将核糖体带到 mRNA 上的起始密码子。

δ 因子　Sigma factor　转录起始因子(86kDa)，结合于大肠杆菌，依赖于 DNA 的 RNA 聚合酶，促进聚合酶附着于 DNA 上特异的转录起始位点。聚合酶附着于 DNA 上后，δ 因子被释放。

信号序列（信号肽）**Signal sequence**（signal peptide）蛋白质始端的一段短氨基酸链，典型的是富含疏水氨基酸的短肽，它协助完整多肽的跨膜转运。

SOS 系统　SOS system　DNA 修复系统，也称作易错修复。在该系统中，损伤 DNA 分子通过掺入一个碱基而被修复。该碱基可以是一个错误碱基，但它容许 DNA 复制。这类修复需要 recA 蛋白。SOS 基因在原核和真核生物细胞周期调控中起作用。

DNA 印迹法（Southern 印迹法）**Southern blotting**　通过吸收将凝胶上经电泳分离的 DNA 片段转移到滤膜上，用放射性标记的互补探针检测特定的碱基序列。

孢子　Spore　由许多原核生物和真菌形成的抗性休眠结构的总称。

底物水平磷酸化　Substrate-level phosphorylation　通过无机磷与活化的有机底物的反应进行高能磷酸键的合成。

终止　Termination　(1)mRNA 合成(即转录)在终止子位点的停止；(2)蛋白质合成(即翻译)在终止密码子位点的停止。

胸腺嘧啶　Thymine（T）一种含氮的碱基，在 DNA 双螺旋结构中与腺嘌呤配对(A-T)。

转录　transcription　以 DNA 为模板在 RNA 聚合酶作用下进行 RNA 的合成。

转录控制　Transcriptional control　通过控制一段 DNA 区段 RNA 转录物的数量进行基因表达的控制，是原核生物和真核生物差异控制蛋白质合成的一个主要调控机制。

转移 RNA　Transfer RNA（tRNA）具有三联核苷酸序列结构的一类 RNA，与 mRNA的三联核苷酸编码序列是互补的。tRNA 在蛋白质合成中的作用是与氨基酸结合并把它们转移到核糖体上。依据 mRNA 所携带的遗传密码，蛋白质在核糖体上组装。

转化　Transformation　使细胞携带的遗传物质由于外源 DNA 掺入其基因组而发生改变的过程。

翻译　Translation　在核糖体上进行的，由 mRNA 所携带的信息来指定一条多肽链中氨基酸序列的过程。

翻译控制　Translational control　通过对翻译步骤的调控进行蛋白质合成的控制。例如，通过有选择的使用已合成的 mRNA 或利用 mRNA 的不稳定性来进行控制。

尿嘧啶　Uracil（U）一种通常只存在于 RNA 中而不存在于 DNA 中的含氮的碱基，尿嘧啶能够与腺嘌呤形成碱基对。

病毒　Virus　一种仅能够在宿主细胞内繁殖的非细胞生物体。病毒由蛋白质包裹的核酸组成；一些动物病毒还由膜所包围。在被感染的细胞中，病毒利用宿主的合成能力生产子代病毒。

索　引

A

氨
　铵吸收，244
　在赖氨酸生物合成中，176～179
　被动扩散，15～16
氨基
　在 $\Delta G^{0\prime}$ 确定中，377～378
氨基酸
　芳香氨基酸生物合成
　　独立途径，326～328
　　模型，322～326
　生物合成，33～35
　分解代谢，32～33
　在 $\Delta G^{0\prime}$ 确定中，377～378
　从代谢途径操作
　　丙氨酸，123
　　对于氨基酸生产，121～122
　　异亮氨酸，125～126
　　苏氨酸，123～125
　　色氨酸，122～123
　由谷氨酸细菌生产，242
　　理论得率，245～250
氨基糖聚合作用，38～41

B

胞内代谢物
　在细胞反应中，48
被动运输
　化合物，15～16
　自由扩散，15
苯丙氨酸
　在芳香族氨基酸生物合成中，323
苯-甲苯-对-二甲苯混合物
　利用 pWW0 降解，154～155
　作为污染物，154～155
　同时生物降解，155～156
苯甲酸
　对酵母菌呼吸的影响，16～17
苯氧乙酸
　解耦影响，16～17
标记，见同位素标记分析
标准态
　习惯，369
标准自由能
　葡萄糖氧化，389～390
　在 EMP 途径中的己糖激酶反应，385
　术语，369
　氧化磷酸化，389～390
　反应，369～370
表观方程
　非平衡热力学，385～386
别构酶
　Hill 方程的应用，97～98
　协同结合，96～97
　协同性，95～96
　非协同位点，96
丙氨酸
　代谢途径合成算法，175～176
　运动发酵单胞菌（*Zymomonas mobilis*）中的合成，123
1,3-丙二醇合成，127～128
丙二酸对质子动力的影响，297
丙二酸作为竞争性抑制剂，91
丙酮
　工业发酵，126～127
丙酮酸
　羧化作用
　　在 PPC 补偿中的作用，258～259
　完全氧化，28～29
　转化为乳酸，26～27
　在 ED 途径中，24
　在 EMP 途径中，22
　TCA 循环同位素标记代谢物中标记的丙酮酸的分布，216～221
　PYR-PEP 分支点处的通量扰动，255～257
　在乙酸积累中的作用，149～151
　在哺乳动物中的应用，227～230
丙酮酸脱氢酶复合物
　在丙酮酸氧化中的作用，28～29
丙酮酸脱羧酶

用于乙醇的生产，118～119
柄状毕赤酵母（*Pichia stipitis*），118
哺乳动物丙酮酸利用，227～230
不定系统
线性规划，201
不可逆抑制
生物合成网络控制，94～95
分子，93

C

草酰乙酸
在赖氨酸生物合成中的作用，179
在 TCA 循环中，28～32
产黄青霉（*Penicillium chrysogenum*）
生长速率，60～61
代谢模型，61
青霉素生产，241
质子梯度，16～17
产黄头孢霉属（*Cephalosporium acremonium*）
抗生素生产，135～136
超定系统
分析，75
代谢通量分析，196～201
成本
乙醇生产，117～119
促进扩散
定义，17
饱和动力学，18～19

D

大肠杆菌（*Escherichia coli*）
乙酸盐的利用，230～232
酶活性的调节，86～87
在乙醇生产中，120～121
发酵途径，26～27
生长，242
靛蓝的生产，145～146
代谢的化学计量学，202～204
混合酸发酵
速率，50～52
比速率，54
过量代谢的防止，149～151
Pho 调节子，106～107
启动子转录起始，98～99
1,3-丙二醇的合成，127～128
色氨酸的合成，122～123
大分子
和组装反应，12
聚合，38～41
转换，42
大偏差理论
基础，300～301
在 FCC 确定中，302
营养物浓度在通量变化中的作用，307
代谢
乙酰-辅酶 A
标记分布，212～214
内源代谢
在细胞反应中，59～60
大肠杆菌（*Escherichia coli*）化学计量学，202～204
异型发酵
乳酸菌，194～196
氮源改变，148
过量代谢防止，149～151
在反应途径分析中，2
代谢产物
在黑箱模型中，68～69
在细胞反应中，48～49
代谢工程
在细胞代谢分析中，6
在途径分析中，5～6
定义，1
在通量控制分析中，4～5
用于乙醇生产的戊糖代谢，128
源于石油的热塑性塑料生产，6～7
在途径表征中的反向代谢工程，1
作用
在生物催化剂生产中，7
化学工程，5
在手性药物生产中，7
通量和途径，3～4
在体内组织和器官代谢中，7～8
代谢控制分析
在通量控制分析中，3～5
热动力学的应用，396～398
基本假设，270～271
与生物反应器控制同等重要性，4
分支途径
应用，291～295
糖原异生作用，295～297
糖酵解，295～297

磷酸化，297～299
义，299
连接定理，274～276
控制系数，272～274
定义，316
弹性系数，274～276
Delgado-Liao 方法的扩展，398
组控制同等重要性，4
中间代谢物反应组
多个分支点中的重叠组，352～354
扰动常数，352
线性途径，286～291
青霉素的生物合成，398～400
生物化学的作用，4～5
遗传学的作用，4～5
加和定理，272～274
理论一般化，276～277
代谢模型
方程，49～50
产黄青霉（*Penicillium chrysogenum*），61
代谢通量
在大肠杆菌（*Escherichia coli*）中的乙酸利用，230～232
在赖氨酸生物合成中的旁路途径，209～212
一致性检验，359～360
应用于预苯酸分支点，363～364
发展，360～363
控制系数
确定，277～279
非线性函数推导，278
定义，2
误差测量影响，364～365
实验证实，359～360
由代谢通量求组控制系数，341
代谢通量与同位素稳态实验，209
优化
算法，355～357
应用于酿酒酵母（*Saccharomyces cerevisiae*），357～359
磷酸果糖激酶扩增，355
哺乳动物中丙酮酸利用，227～230
与物质结构特性的关系，8
作用
在细胞生理学中，2～3
在代谢工程中，3～4
营养物浓度，307
来自瞬时强度测量，208～209
代谢通量分析
替代生物化学途径，182～183
对于细胞培养基设计的应用，268
分支点的控制，182
柠檬酸发酵，188～192
谷氨酸棒杆菌（*Corynebacterium glutamicum*）的缺失突变，257～258
转氢酶发现，259～261
定义，5
途径代谢物的稀释影响，184～185
大肠杆菌（*Escherichia coli*）代谢，202～204
胞外通量，182～183
乳酸菌的异型发酵代谢，194～196
线性相关反应化学计量式，192～194
赖氨酸生物合成，186～188
描述，250～251
在 Glc6P 分支点的扰动，252～255
在 PEP-丙酮酸分支点的扰动，255～257
主节点识别，251～252
哺乳动物细胞培养
描述，261
胞内通量，261～265
同位素标记研究，265～268
最大理论得率，183
用 NMR，8
超定系统，196～201
敏感性分析，204～205
理论，184
不定系统，201～202
代谢通量控制
经由代谢工程的分析，3～5
过量呼吸，298～299
在单一分支点，313～316
途径的结构，6
代谢图定义，5
代谢途径合成
算法，167～173
丙氨酸合成，175～176
分析，180～181
赖氨酸生物合成，176～179
替代物，179
最大得率限制，179～180
草酰乙酸的作用，179
概述，173
丝氨酸合成，174～175

定义，166～167
代谢网络
代谢网络分析与代谢工程，5～6
抗生素生产，135～136
芳香族氨基酸生物合成，323～329
生物聚合物生产，140～141
生物素生产，139
分支的
分支点，304～305
CCC 和浓度变化，307
通量变化预测，305～306
分支点位置
ATP，329～333
分支酸，335～336
1,6-二磷酸果糖，334～335
6-磷酸葡萄糖，333～334
3-磷酸甘油醛，334～335
连接代谢物和组通量，328～329
预苯酸，336～338
5-磷酸木酮糖，335～336
复杂代谢网络的定义，311
控制系数，339～341
共聚物生产，142～143
乙醇生产
作为生物燃料，117
由大肠杆菌（*Escherichia coli*），120～121
通过发酵代谢，118～119
由 *pdc* 和 *adh* 基因，120
生产，117～119
由丙酮酸脱羧酶 119
由酿酒酵母（*Saccharomyces cerevisiae*），118
通量控制结构，6
果聚糖的生产，144
组 CCC（gCCC），344
组控制系数，339～341
ATP 分支点，346～347
FDP/GAP 的分支点，348
从通量测量，341
6-磷酸葡萄糖分支点，347～348
PPH 分支点，349～350
X5P+CHR 分支点，349
组 FCC（gFCC），317～322
从已表征的扰动，343～344
实验确定，350～352
从 3 个扰动，341～343
独立途径的识别，317～322
靛蓝的生产，145～146
通过矩阵代数确定核心矩阵，320～321
操作
对于氨基酸的生产
丙氨酸，123
商业用途，121～122
异亮氨酸，125～126
苏氨酸，123～125
色氨酸，122～123
在微生物中，1
对于溶剂生产
工业发酵，126
1,3-丙二醇，127
营养物浓度和通量变化，306～307
扰动的可观测性，344
植物聚羟基链烷酸酯［poly（hydroxyalkanoate)]，143～144
聚羟基链烷酸酯[poly（hydroxyalkanoate)]的生产，141～142
调节
分支点分类，110～111
在真核细胞中，108～109
途径，107～110
在原核细胞中，108～109
在代谢工程中的作用，3～4
总体流通代谢物的作用，112～113
SIMS 矩阵分析，318～319
底物范围扩展
纤维素-半纤维素的解聚，132
用于乙醇，129～132
利用乳糖和乳清，132～134
戊糖用于乙醇生产，128
酵母，129
淀粉降解微生物，134～135
利用蔗糖，134
未分支的
大偏差理论的基础，300～301
FCC 估计，301～302
基于大偏差理论的 FCC，302
通量变化
由酶的改变，303
预测，302～303
通量通过，299
维生素 A 生产，140
维生素 C 生产，139
黄原胶生产，144～145

异生物的降解，152～153
得率和生产能力，116
代谢物
在生物化学途径中，173
NMR 分析代谢物碳原子，222～227
在代谢网络中总体流通代谢物的作用，111～113
中间连接代谢物
组 FCCs（gFCCs），354～355
在细胞反应中的胞内代谢物，48
同位素标记物
完全列举，214～216
直接碳原子平衡，232～237
TCA 循环中的分布
从标记的乙酸，221～222
从标记的丙酮酸，216～221
连接
组 CCC（gCCC），344
识别，328～329
中间连接代谢物
组 FCCs 的（gFCCs），354～355
途径
代谢物的稀释影响，184～185
前体物代谢物
在生物合成反应中，12
在 FCC 中测量瞬时代谢物，284～286
代谢因子
在生物合成反应中，12
单磷酸己糖
在糖酵解中，21
单细胞蛋白生产，148
胆固醇合成与消除，102
蛋白质
聚合作用，38～41
氮
替代的氮代谢，148
倒数关系
非平衡热力学，388
得率系数，68～69
在黑箱模型中，
计算，71
细胞反应，59～61
滴定
在 FCC 中用纯化酶滴定，280～281
在 FCC 中用特异性抑制剂滴定，281～282
底物
在细胞反应中，48
在动态质量平衡中，56～57
底物抑制
竞争性抑制，90～91
非竞争性抑制，91～92
快速平衡，88～89
作为简单可逆抑制系统，90
稳态方法，89
反竞争性抑制，93
电解
在氢生产中，146
电势梯度及维持，42
电子传递
从 NADH 到氧，29～30
淀粉
微生物降解，134～135
靛蓝生产，145～146
丁醇
工业发酵，126～127
动力学模型
动态质量平衡，57～58
弹性系数计算，284
酶，87～88
用于 FCC，286
酿酒酵母（*Saccharomyces cerevisiae*），350～352
促进扩散的饱和动力学模型，18～19
动态质量平衡
在细胞反应中，54～55
推导，55～59
菌体组成，57
底物，56～57
对-二甲苯-苯-甲苯混合物
利用 pWW0 降解，154～155
作为污染物，154～155
同时生物降解，155～156
多氯化联苯
代谢工程，152～154
多糖
在芳香族氨基酸生物合成中，323

E

恶臭假单胞菌（*Pseudomonas putida*）
pWW0 用于污染物的降解，154～155
1,3-二磷酸甘油酸
在 EMP 途径中，22
1,6-二磷酸果糖

在芳香氨基酸生物合成中，323
在代谢网络模型中作为分支点，334～235，348
二氧化碳
被动扩散，15～16
在 PP 途径中，22～24
二异丙基磷酸氟化物
作为不可逆抑制剂，93

F

发酵
乙醇，27～28
柠檬酸发酵的代谢通量分析，188～192
在氢的生产中，146
工业溶剂，126～127
在大肠杆菌（*Escherichia coli*）中混合酸发酵，
速率，50～52
比速率，54
戊糖，由微生物，118
丙酮酸转化为乳酸，26～27
翻译
酶控制，101～102
反竞争性抑制特性，93
反馈
在天冬氨酸途径中的控制，94～95
抑制和激活模式，87
反应
通过代谢和细胞生理学分析，2
在细胞代谢中的组装反应，12
在细胞代谢中的生物合成反应，12～13
细胞的反应，见细胞途径
化学反应
乙醇脱氢酶催化的化学反应的 $\Delta G^{0\prime}$，383～384
吉布斯自由能的算法，372～374
在吉布斯自由能确定中的基团贡献，377～381
热力学可行性，371～372
整体流通代谢物在耦合反应中的作用，111～113
供能反应
在细胞代谢中，12
目的，21
糖酵解反应的自由能，370～371
组 FCC（gFCC），316～317
分组，316
独立途径识别，317～322
Michaelis-Menten 反应饱和动力学，18～19
在细胞代谢中的聚合反应，12
SIMS 矩阵分析，317～319
标准自由能，369～370
反应速率
在黑箱模型中，68～69
在大肠杆菌（*Escherichia coli*）中的混合酸发酵的比速率，54
反应组中间代谢物的控制分析
在多分支点中的重叠组，352～354
扰动常数，352
方差-协方差矩阵计算误差，81
方程
Hill 方程应用于别构酶，97～98
细胞反应的线性速率方程，59～61
非平衡热力学的表观方程，385～386
放线菌
作为聚酮化合物来源，136～137
放线菌紫素
生产，135～136
非竞争性抑制特性，91～92
非平衡热力学
细胞生长，393～394
细胞系统，384
定义，384
耗散函数，385
效率，389
能量转导，384
流-力关系，387～388
力比，387～389
目标，396
EMP 途径中己糖激酶反应，385
独立反应，365～366
水平流，387～389
线性力关系，394～396
Onsager 的倒数关系，386
操作计量系数，387～389
氧化磷酸化，389～393
表观方程，385～386
表观计量系数，387～389
质子动力，390
倒数关系（可逆性，相关性），387～389
静头，388～389
非线性函数推导，278
分解代谢
脂肪酸、有机酸和氨基酸，32～33
分支点
在 ATP 处组控制系数，346～347

在代谢网络中的分类，110～111
在细胞途径中的控制，182
在 FDP/GAP 处的组控制系数，348～349
在 Glc6P 处的代谢通量扰动，252～255
在 G6P 处的组控制系数，347～348
代谢控制分析
应用，291～295
糖原异生作用，295～297
糖酵解，295～297
氧化磷酸化，297～299
在代谢网络中，304～305
ATP，329～333
分支酸，335～336
1,6-二磷酸果糖，334
6-磷酸葡萄糖，333～334
3-磷酸甘油醛，334～335
连接代谢物和组通量，328～329
预苯酸，336～338
5-磷酸木酮糖，335～336
多个、重叠着的反应组，352～354
PEP-丙酮酸处的通量扰动，255～257
PPH 处的组控制系数，349～350
预苯酸处组 FCC（gFCC）一致性检验的应用，363～364
单一分支点处的通量分布的控制，313～316
X5P+CHR 处的组控制系数，349
分支酸
在芳香族氨基酸生物合成中，323
在代谢网络模型中作为分支点，335～336，350
辅酶
在生物合成反应中，12～13

G

甘油
在芳香族氨基酸生物合成中，323
肝脏细胞
老鼠肝脏细胞中糖原异生作用和糖酵解，295～297
供能反应
在细胞代谢中，12
目的，21
共聚物生产，142～143
谷氨酸
生成的吉布斯自由能，381～382
谷氨酸棒杆菌（*Corynebacterium glutamicum*）
在氨基酸生产中，121～122
缺失突变菌的代谢通量分析，257～258
转氢酶的发现，259～261
异亮氨酸合成，125～126
赖氨酸生物合成合成代谢通量分析，
描述，250～251
在 Glc6P 分支点处的扰动，252～255
在 PEP-丙酮酸分支点处的扰动，255～257
主节点识别，251～252
赖氨酸生产，24
丙酮酸羧化，由 PPC 补偿，258～259
苏氨酸合成，123～125
谷氨酸脱氢酶
产生，148
谷氨酸细菌
氨基酸生产，242，245～250
生物化学和调节，242～245
寡霉素
用于弹性系数的确定，298
管囊酵母（*Pachysolen tannophilus*），118
果聚糖生产，144
果糖磷酸化，21～22

H

耗散函数
在非平衡热力学中，384～385
核磁共振分析
代谢数据，222～227
代谢通量，8～9
核苷酸生物合成，36
核心矩阵
通过矩阵代数确定，320～321
黑曲霉（*Aspergillus niger*）
在抗生素生产中，135～136
黑箱模型
细胞生物质，67～68
简单的
碳平衡，70
描述，68
元素平衡，70～71
一般化还原度平衡，71～72
代谢的，49～50，61
变量，68～69
红霉素
由红色糖多孢菌（*Saccharopolyspora erythrea*）生产，137～139
红色糖多孢菌（*Saccharopolyspora erythrea*）

红霉素生产，137～139
呼吸
过量呼吸通量控制，298
安息香酸对酵母呼吸的影响，16～17
胡萝卜软腐欧文氏菌（*Erwinia carotovora*）
用于纤维素-半纤维素的解聚，132
化石燃料
乙醇作为生物燃料取代，117
化学反应
乙醇脱氢酶催化的反应 $\Delta G^{0\prime}$，383～384
吉布斯自由能算法，372～374
在吉布斯自由能确定中的基团贡献，377～381
热力学可行性，371～372
化学工程
在代谢工程中的作用，5～6
化学计量学
细胞反应
菌体组分，48
胞内代谢物，48
代谢产物，48
底物，48
在大肠杆菌（*Escherichia coli*）代谢中，202～204
在非平衡热力学中操作的化学计量学，386～389
在非平衡热力学中表观的化学计量学，386
代谢通量分析中线性相关反应的化学计量学，192～194
黄原胶生产，144
回补途径
TCA 循环，30～31
混合酸
在大肠杆菌（*Escherichia coli*）中发酵
速率，50～52
比速率，54
混合物
苯-甲苯-对二甲苯
利用 pWW0 降解，154～155
作为污染物，154～155
同时生物降解，155～156
酵母生长中的葡萄糖-乙醇混合物，242

J

基团贡献方法
在吉布斯自由能确定中，377～381
基团转位
在主动运输中，19～20
基因
酶的改变，279～280
血红蛋白基因的克隆，149
在乙醇生产中的 PDC 和 ADH 基因，120
对于乙醇生产的戊糖代谢，128
稳定性维持，152
基因工程
在代谢途径操作中，1
基因调节网络
胆固醇的合成和排除，101～102
激烈火球菌（*Pyrococcus furisous*）
在氢生产中，146～147
吉布斯自由能
乙醇脱氢酶催化的反应，383～384
ATP 生成，382～383
确定，366～368
谷氨酸的生成，381～382
由基团贡献，377～381
在生长能学中，41
反应的吉布斯自由能的算法，372～374
与热力学可行性的关系，371～372
在底物中，73
己糖激酶
在 EMP 途径中的反应，385
计算机程序
MATLAB、MATHCAD 和 MATHEMATICA，78
加和定理
在代谢控制分析中，272～274
假丝酵母（*Candida shehatae*）用于戊糖发酵，118
简单黑箱模型
碳平衡，70
描述，68
元素平衡，70～71
一般化还原度平衡，71～72
代谢
方程，49～50
产黄青霉（*Penicillium chrysogenum*），61
降解
生物降解 BTX 混和物，154
异生素降解，152
酵母
培养
没有乙醇形成的好氧培养，78～80，81～82
厌氧培养的数据一致性，73
在测量中的误差诊断，82～83

用于乙醇生产，129
热量产生，73～74
木糖醇生产，147
解聚
纤维素-半纤维素，132
解脂假丝酵母（*Candida lipolytic*）柠檬酸发酵的代谢通量分析，188～192
竞争性抑制特性，90～91
静头
在非平衡热力学中，388～389
酒精
发酵途径，26～28
被动扩散，15～17
酒精脱氢酶
催化反应的 $\Delta G^{0'}$，383～384
菊欧文氏菌（*Erwinia chrysanthemi*）
用于纤维素-半纤维素的解聚，132
矩阵
在同位素分布模型中的原子作图矩阵，237～240
在超定系统中缩减的冗余矩阵，196
SIMS
对芳香族氨基酸的生物合成，326～328
对独立途径识别，318～319
在核心矩阵确定中，320～321
方差-协方差矩阵计算误差，70～71
矩阵代数
在核心矩阵确定中，320～321
矩阵运算
基本矩阵运算，76～77
矩阵求逆，77～78
矩阵转置，77
方差-协方差矩阵计算误差，70～71
聚合作用
在细胞代谢中，12
纤维素-半纤维素的解聚，132
大分子，38～41
聚（3-羟基丁酸）和聚（3-羟基戊酸）生产，142～144
聚（3-羟基丁酸）生产，142～144
聚羟基链烷酸酯［poly（hydroxyalkanoate)］
植物中生产，143～144
生产，141～142
聚酮化合物
来源，136
系统形成，138～139

K

抗生素
通过代谢途径生产，135～136
控制同等重要性，在代谢控制分析中
生物反应器控制同等重要性，4
组控制同等重要性，4
控制系数
组，见组控制系数
在代谢网络中，339～341
用于酿酒酵母（*Saccharomyces cerevisiae*）通量优化，357～359
枯草芽孢杆菌（*B. subtilis*）
乙酰乳酸合成酶，150～151
扩散
促进扩散
定义，17
饱和动力学，18～19
自由扩散
在被动运输中，15

L

赖氨酸
生物合成
替代物，179～180
旁路途径通量，209～212
由葡萄糖和氨，176～179
组 FCC（gFCC），343
最大得率限制，179～180
代谢通量，186～188
代谢通量分析
描述，250～251
在 Glc6P 分支点处的扰动，252～255
在 PEP-丙酮酸分支点的扰动，255～257
主节点识别，251～252
草酰乙酸的作用，179
生成途径，244
酪氨酸
在芳香族氨基酸生物合成中，323～325
力比
在非平衡热力学中，387
连接代谢物
组 CCC（gFCC），344
识别，328～329
中间代谢物连接的组 FCCs（gFCCs），354～355
连接定理

在代谢控制分析中，274～276
链霉菌属 *Streptomyces coelicitor*
在抗生素生产中，136～137
链霉菌属 *Streptomyces erythreus*
在抗生素生产中，136～137
链霉素生产，136～137
量热计
用于测量热，74
列举
完全的同位素标记代谢物，215～217
4-磷酸赤藓糖
在芳香族氨基酸生物合成中，323～324
3-磷酸甘油醛
在芳香族氨基酸生物合成中，323～324
在代谢网络模型中作为分支点，324～325，348～349
在 ED 途径中，23～24
在 EMP 途径中，22
3-磷酸甘油醛脱氢酶
弹性系数，296
磷酸甘油酸变位酶
弹性系数，296
3-磷酸甘油酸激酶
弹性系数，296
6-磷酸果糖
在 EMP 途径中，22
在糖酵解中，21～22
磷酸果糖激酶
通量扩增，355
5-磷酸核酮糖
在 PP 途径中，21～24
在芳香氨基酸生物合成中，323
在代谢网络模型中作为分支点，335～336，349
磷酸化（作用）
氧化磷酸化
在线粒体中的控制，297～299
非平衡热力学，389～393
和 TCA 循环，28～30
在信号转导中，105～107
磷酸己糖异构酶
在糖酵解中，21～22
6-磷酸葡糖酸
在 ED 途径中，24
在 PP 途径中，23～24
6-磷酸葡糖酸脱水酶
在 ED 途径中，24
1-磷酸葡萄糖
在糖酵解中，21～22
6-磷酸葡萄糖
在芳香族氨基酸生物合成中，323
分支点的代谢通量扰动，252～255
在代谢网络模型中作为分支点，333～334，347～348
在糖酵解中，21～22
在 PP 途径中，22～24
磷酸戊糖途径
回补功能，23
在 *Aspergillus nidulans*（巢曲霉）中，24
控制点，24～25
在糖酵解中，21
氧化功能，23
反应，22～23
磷酸烯醇丙酮酸
在芳香族氨基酸生物合成中，323
在基团转位中，19～20
在 PEP-丙酮酸分支点的通量扰动，255～257
磷酸烯醇丙酮酸羧化酶
作为回补反应，244
补偿，258～259
磷酸转移酶
葡萄糖吸收，48～49
在基团转位中，19～20
流-力关系
在非平衡热力学中，387～388
绿藻（*Chlamaydomonas reinhardtii*）
在氢生产中，147

M

脉孢菌（*Neurospora crassa*）
在抗生素生产中，136
梅德霉素生产，136
酶
在大肠杆菌（*Escherichia coli*）中的活性与调节，86～87
别构酶
Hill 方程的应用，97～98
协同结合，96～97
协同性，95～96
非协同性位点，96
变化
在通量变化确定中，303
生物合成网络的控制，94～95

遗传改变，279～282
在氢生产中，146
动力学，87～88
纯化酶在 FCC 滴定中，280～281
转录控制，98～101
翻译控制，101～102
酶Ⅰ
在主动运输中，19～20
酶Ⅱ
在主动运输中，19～20
敏感性分析和代谢通量分析，204～205
模型
芳香族氨基酸生物合成，322～326
黑箱
细胞菌体，67～68
变量，68～69
复杂系统
利用生化系统理论，270～271
同位素分布
利用原子作图矩阵，237～240
动力学
动态质量平衡，57～58
弹性系数计算，284
酶，87～88
用于 FCC，286
酿酒酵母（*Saccharomyces cerevisiae*），350～352
促进扩散的饱和动力学，18～19
非平衡热力学黑箱模型，394
简单黑箱模型
碳平衡，70
描述，68
元素平衡，70～71
一般化还原度平衡，71～72
木糖
用于乙醇生产，129～131
木糖醇生产，147
木质纤维素
在乙醇生产中，117

N

能
自由能，见自由能
产生与解耦，16～17
能量转导的定义，384
能学
酿酒酵母（*Saccharomyces cerevisiae*），64～66
酿酒酵母（*Saccharomyces cerevisiae*）
厌氧生长，241～242
芳香族氨基酸生物合成模型，322～326
培养中测量的误差诊断，82～83
数据一致性，73
能学，64～66
乙醇生产，118～119
通量优化，357～359
葡萄糖
转化为乙醇，27～28
促进扩散，17
在葡萄糖-乙醇混合物中生长，241～243
热量产生，73～74
动力学模型，350～352
预苯酸分支点
组 FCC（gFCC）一致性检验的应用，363～364
安息香酸对呼吸的影响 16～17
简单黑箱模型，68
淀粉降解，134～135
糖的磷酸化（作用），21～22
柠檬酸
在 TCA 循环中，28～29
柠檬酸发酵的代谢通量分析，188～192
柠檬酸合成酶
在 TCA 循环中，28～29
浓度
用 CCC 预测变化，306
营养在通量改变中的作用，306～307
浓度控制系数
组浓度控制系数
确定，344
由通量测定，341
在代谢网络中，339～341
在浓度变化的预测中，306
浓度梯度维持，42

P

培养基
通量分析在细胞培养设计中的应用，268
偏差理论（大偏差理论）
基础，300～301
在 FCC 测定中，302
营养物浓度在通量改变中的作用，306～307
平衡

在底物抑制中的快速平衡，88～89
葡萄糖
转化为乙醇，26～28
酵母生长中的葡萄糖-乙醇混合物，241～242
促进扩散，17
在赖氨酸生物合成中，176～179
氧化标准自由能，393
磷酸化，21～22
运输，244
通过磷酸转移酶系统来吸收，48～49
葡萄糖磷酸变位酶
在糖酵解中，21～22
葡萄糖脱氢酶
在氢生成中，146～147

Q

启动子
细菌转录起始，98～99
器官
代谢工程在整个器官的体内代谢中的作用，7～8
浅青紫链霉菌（*Streptomyces lividans*）
在抗生素生产中，136
强度
在代谢通量确定中的瞬时强度，208～209
3-羟基丁酸
在共聚物生产中，142～143
3-羟基戊酸
在共聚物生产中，142～143
青霉素
生物合成
运用热动力学的代谢控制分析的应用，398～400
代谢控制分析，288～291
生产，135～136，241
氢
产生，146～147
氢化酶
在氢生成中，146～147

R

扰动
来自已表征扰动的组 FCC（gFCC），343～344
用于组 FCC（gFCC），344，354～355
在一致性检验开发中的多个扰动，360～363
在组 FCC（gFCC）测定中的 3 个扰动，341～343
扰动常数
在中间代谢物反应组的代谢控制分析中，352
热
平衡，73
在厌氧和好氧生长时的热量产生，73～74
热动力学
对代谢控制分析的应用，396～398
Delagdo-Liao 方法的扩展，398
在青霉素生物合成的代谢控制分析中，398～400
热力学
第一定律，366
非平衡，见非平衡热力学
第二定律，366
热力学第二定律定义，366
热力学第一定律定义，336
热力学可行性，
算法，372～374
化学反应，371～372
EMP 途径，374～377
来自基团贡献的吉布斯自由能，377～381
运输过程，371～372
热塑性塑料
源于石油的热塑性塑料的代谢工程，6～7
溶剂
工业发酵，126～127
冗余矩阵
在超定系统中缩减的冗余矩阵，197～198
乳清
利用，132～134
乳酸
细菌异型发酵代谢的代谢通量分析，194～196
由丙酮酸，26～27
乳酸脱氢酶，丙酮酸转化到乳酸，26～27
乳糖，利用，132～134

S

色氨酸
酿酒酵母（*Saccharomyces cerevisiae*）中通量的释放，357～359
大肠杆菌（*Escherichia coli*）中的合成，121～122
色素
生物色素的生产，145～146
生化系统理论，模拟复杂系统，271
生物催化剂生产，6～7
生物反应器

分批式，55
连续式，55
动态，54～55
流加式，55
生物反应器控制当量
在代谢控制分析中，4
生物合成反应
氨基酸，33～35
芳香氨基酸
独立途径，327～328
模型，322～326
在细胞代谢中，12，33
通过酶活性控制，94～95
脱氧核糖核苷酸，36
脂肪酸，36～37
脂类，36～37
赖氨酸
替代物，179
旁路途径通量，209～212
来源于葡萄糖和氨，176～179
组 FCC（gFCC），343
最大得率限制，179～180
代谢通量，186～188
代谢通量分析
描述，250
在 Glc6P 分支点处的扰动，252～255
在 PEP-丙酮酸分支点处的扰动，255～257
主节点的识别，251～252
草酰乙酸的作用，179
核苷酸，36
青霉素
运用热动力学的代谢控制分析的应用，398～400
代谢控制分析，289～292
贮藏糖类，37
生物化学
谷氨酸菌，242～245
在代谢控制分析中作用，4～5
生物化学途径
识别，182～183
代谢物参与，173～174
生物降解
BTX 混合物，154～155
生物聚合物
由生物体生产，140～141
生物燃料
乙醇，117～121
生物素
生产，139～140
生物质
细胞
在黑箱模型中，67～68
干重，12～13
组分
在细胞反应中，48
在动态质量平衡中，57
生长
细胞
有机酸的影响，149
非平衡热力学描述，393～394
能学
定义，41
大肠杆菌（*Escherichia coli*），242
产黄青霉（*Penicillium chrysogenum*），速率，60～61
酿酒酵母（*Saccharomyces cerevisiae*）
厌氧生长，242
在葡萄糖-乙醇混合物中，242
酵母，热量产生
好氧生长，73～74
厌氧生长，73～74
嗜酸热原体（*Thermoplasma acidophilum*）
在氢的生产中，146～147
数据一致性
在厌氧酵母培养中，73
水平流
在非平衡热力学中，389
丝氨酸代谢途径合成算法，174～175
四氢吡啶二羧酸转化，209～211
松弛时间
在细胞代谢中的松弛时间，14～15
苏氨酸
在谷氨酸棒杆菌（*Corynebacterium glutamicum*）中的合成，123～125
速率
对于别构酶简化了的速率，97～98
速率方程
细胞反应线性速率方程，59～61
算法
反应的吉布斯自由能变化，372～374
代谢通量优化，355～357
代谢途径合成

丙氨酸合成，175～176
分析，180～181
实施，167～172
赖氨酸生物合成，176～179
替代，179～180
最大得率限制，179～180
草酰乙酸的作用，179
概述，173～176
丝氨酸合成，174～175
羧化作用
丙酮酸对 PPC 的补偿，258～259
羧酸
在 $\Delta G^{0\prime}$确定中，378

T

弹性系数
由动力学模型计算，284
糖原异生作用，295～296
碳
在简单黑箱模型中的平衡，70
直接平衡，232～237
在 TAC 循环中，28～29
羰基氰化物对-三氟-甲氧基苯腙
对质子动力的影响，298
糖
氨基糖，38～41
聚合作用，38～41
贮藏和合成，37～38
世界范围的生产，6～7
糖酵解
定义，21
自由能，370～371
Leloir 途径，21～22
老鼠肝脏细胞，295～297
糖，21～22
糖原异生作用
老鼠肝脏细胞，295～297
梯度
用于维持的浓度梯度，42
在产黄青霉（*Penicillium chrysogenum*）中的质子梯度，16～17
天冬氨酸
途径及反馈控制，94～95
条件数计算，205
通量控制系数
变化预测，302～303，305～306
确定，277～279
双调节法，282～283
弹性系数，284
由酶的改变，303
用于估计的表达式，302
已表达酶的基因变化，279～280
组通量控制系数
定义，311～313，316～317
经由矩阵代数的核心矩阵确定，320～321
SIMS 矩阵分析，318～319
动力学模型，286
从大偏差而来，303
矩阵，291
在代谢控制分析中，272～274
非线性函数的确定，278
单调节，283
用纯化酶的滴定，280～281
用特异抑制剂的滴定，281～282
自上而下法，283～284
瞬态代谢物测量，284～286
通透酶
在主动运输中的作用，19
同位素标记代谢物
完全列举，214～216
直接碳原子平衡，232～237
TCA 循环中同位素标记代谢物的分布
来自标记的乙酸，221～222
来自标记的丙酮酸，216～222
同位素标记分析
乙酸盐，221～222
在大肠杆菌（*Escherichia coli*）中的乙酸盐利用，230～232
乙酰-辅酶 A 代谢，212～214
在同位素标记代谢物的完全列举中，214～216
用原子作图矩阵模拟同位素分布，237～240
在哺乳动物细胞培养中的通量，265～268
细菌的乙醛酸支路途径，232
代谢物碳原子 NMR 分析，222～227
丙酮酸，216～221
在哺乳动物中的丙酮酸利用，227～230
稳态试验，209
细菌的 TCA 循环，232
2-酮-L-葡萄糖酸
商业生产，139
2-酮-3-脱氧-6-磷酸葡萄糖酸
在 ED 途径中，23～24

2-酮-3-脱氧-6-磷酸葡萄糖酸醛缩酶
在 ED 途径中，23～24
α-酮戊二酸
在 TCA 循环中，30～32
α-酮戊二酸脱氢酶
在 TCA 循环中，28～29
头孢菌素 C 的生产，135～136
透明菌属（*Vitreoscilla*）
血红蛋白基因克隆，149
突变体
谷氨酸棒杆菌（*Corynebacterium glutamicum*）
缺失突变体的代谢通量分析，257～261
图
代谢图的定义，5
3-脱氧-D-阿拉伯型庚酮糖酸-7-磷酸
在芳香族氨基酸生物合成中，323
脱氧核糖核苷酸生物合成，36
脱氧核糖核酸
聚合，38～41
重组
在代谢途径操作中，1

W

微生物
在代谢途径操作中，1，134～135
维生素 A 生产，140
维生素 C 生产，139
污染物
转化为非污染物，154
戊糖
用于乙醇的生产
代谢工程，128
利用酵母，129
微生物的戊糖发酵，118
生产，147
误差
在酵母培养测量中的诊断，82～83
在过失测量中，75
在代谢通量测定中，364～365
在方差-协方差矩阵计算中，81

X

烯醇化酶弹性系数，296
系数
浓度控制，306
控制，339～341，357～359
弹性
由动力学模型计算，284
糖原异生作用，295～297
在代谢控制分析中，274～276
通量控制，见通量控制系数
对于代谢控制分析，299
得率
在黑箱模型中，68～69
计算，71
细胞反应，59～61
细胞
老鼠肝脏中糖原异生和糖酵解，295～297
完整细胞总体调控
定义，102～105
通过磷酸化作用的信号转导，105～107
细胞代谢
用代谢工程分析，6
组装反应，12
生物合成反应，12
干细胞重生物质，12
供能反应，12
途径集成，13
聚合反应，12
松弛时间，14～15
NADH 和 NADPH 的作用，24～25
细胞工程
对于细胞性质，148
遗传稳定性的维持，149～151
氮代谢改变，148
过度代谢防止，149～151
对于氧的利用，148～149
底物利用改变，151～152
细胞合成
生物合成反应，33
细胞培养
哺乳动物的代谢通量
描述，261
胞内通量，261～265
同位素标记研究，265～268
在代谢通量分析中，培养基设计的应用，268
细胞生理学
在反应途径分析中，2
代谢通量的作用，3
细胞生物质
在黑箱模型中，67～68
干细胞重生物质，12

细胞生长
有机酸的影响，149～150
非平衡热力学描述，393～394
细胞途径
分支点控制，182
动态质量平衡，54～55
线性速率方程，59～61
代谢模型，49～50
代谢物
稀释影响，184～186
大肠杆菌（*Escherichia coli*）的混合酸发酵
速率，52～53
比速率，54
非平衡的热力学，384
化学计量学
菌体组成，48
胞内代谢物，48
代谢产物，48
底物，48
得率系数，59～61
细菌
谷氨酸
氨基酸生产，242，245～250
生物化学和调节，242～245
乙醛酸支路，232
乳酸异型发酵代谢的代谢通量分析，194～196
TCA 循环，232
纤维素-半纤维素的解聚，132
线粒体
内膜，29～30
氧化磷酸化控制，297～299
线性规化
不定系统，200～202
线性力关联
在非平衡热力学中，394～396
线性速率方程
细胞反应，59～61
效应物扩增因子
在营养物浓度计算中，307
信号转导
通过磷酸化作用，105～107
血红蛋白基因克隆，149

Y

氧
被动扩散，15
利用，148～149
氧化
丙酮酸，28～29
氧化磷酸化
在线粒体中的控制，297～299
非平衡热力学，389～393
与 TCA 循环，28～30
药物
通过代谢工程生产手性药物，7
一致性检验，用于组 FCCs（gFCCs）
对预苯酸分支点的应用，363～364
特性，359～360
发展，360～363
遗传学
在代谢控制分析中的作用，4～5
乙醇
好氧酵母培养中不生成，78～80，81～82
作为生物燃料，117
来自发酵代谢，118～119
来自葡萄糖的转化，27～28
在酵母生长中的乙醇-葡萄糖混合物，241～242
工业发酵，126～127
生产，117～118
由大肠杆菌（*Escherichia coli*），118～120
由 PDC 和 ADH 基因，120
戊糖代谢，128
由丙酮酸脱羧酶，119
由酿酒酵母（*Saccharomyces cerevisiae*），118
由酵母，129
由运动单胞菌（*Zymomonas mobilis*），129～131
真核细胞代谢网络调节，108～109
分泌
乙酸盐，149～150
乙醛酸
在细菌中的支路途径，232
乙醛脱氢酶
在酒精发酵中，26
乙酸
分泌，149～151
同位素标记的 TCA 循环代谢物，221～222
在大肠杆菌（*E. coli*）中的利用，230～232
乙酰辅酶 A
生成，28～30
代谢，标记物分布，212～215
乙酰乳酸合成酶

在枯草芽孢杆菌（*B. subtilis*）中，150～151
异亮氨酸
在谷氨酸棒杆菌（*Corynebacterium glutamicum*）中的合成，125～126
抑制系统
竞争性抑制系统的特征，90～91
不可逆抑制系统
生物合成网络控制，94～95
分子，93
非竞争性抑制系统的特性，91～92
简单可逆底物抑制系统，90
底物
竞争性抑制，90～91
非竞争性抑制，91～92
快速平衡，88～89
作为简单可逆抑制系统，90
稳态方法，89
反竞争性抑制，93
滴定，在 FCC 中，281
反竞争性滴定在 FCC 中的特性，93
营养物
在通量变化中的作用，307
吸收，151～152
有机酸
分解代谢，32～33
对 ATP 的影响，16～17
对细胞生长的影响，149～150
预苯酸
在芳香族氨基酸生物合成中，323～324
分支点
组 FCC（gFCC）一致性检验中的应用，363～364
在代谢网络中，336～338
元素平衡
一般化还原度平衡，71～72
在简单黑箱模型中，70～71
原核细胞
代谢网络调节，108～109
原子作图矩阵
在同位素分布模型模拟中，237～239
运动发酵单胞菌（*Zymomomas mobilis*）
丙氨酸合成，123
用于乙醇生产，129～131
运输
主动运输
ATP 消耗，19～21
基团转位，19～20
通透酶的作用，19
通过 ATP 酶，19～20
从 NADH 到氧的电子转移，29～30
葡萄糖，244
机制，15
被动运输
化合物，15～16
自由扩散，15
热力学可行性，371～372

Z

载体-底物复合物
在 Michaelis-Menten 反应中，18～19
蔗糖利用，134
整个细胞全局控制
定义，102
通过磷酸化的信号转导，105
脂肪分解代谢，32～33
脂肪酸
生物合成，36～37
被动运输，15～16
脂类
生物合成，36～38
聚合，38～41
质粒
质粒 pWW0 用于污染物降解，154～155
质子梯度
在产黄青霉（*Penicillium chrysogenum*）中，16～17
质子-动力
线粒体的质子-动力分析，296
在氧化磷酸化作用中，390
中间代谢物连接
组 FCC（gFCC），354～355
主动运输
ATP 消耗，19～21
基团转运，19～20
通透酶的作用，19
经由 ATP 酶，19～20
贮藏糖类
UDP-葡萄糖在合成贮藏糖类中的作用，37～38
专性甲基营养菌（*Methylophilus methylotrophus*）
单细胞蛋白生产，148
转录控制
细菌启动子，98～99

乳糖（*lac*）操纵子，99～100
转氢酶发现，259～261
转位
在主动运输中的基团转位，19～20
自上而下法
组 FCC（gFCC）的实验确定，350～352
由通量测量而来的组控制系数，341
需要，316
代谢网络中的控制系数，339～341
对于组控制系数的确定
ATP 分支点，346～347
FDP/GAP 分支点，348～349
G6P 分支点，347～348
PPH 分支点，349～350
X5P＋CHR 分支点，349
自由能
吉布斯，见吉布斯自由能
糖酵解反应，370～371
标准自由能
葡萄糖氧化，393
在 EMP 途径中的已糖激酶反应，385
术语，369
氧化磷酸化，389～392
反应，369～370
总体控制，在整个细胞水平上
定义，102～105
通过磷酸化作用的信号转导，105～107
组氨酸蛋白
在主动运输中，19～20
组控制同等重要性
在代谢控制分析中，4
组控制系数，代谢网络模型
ATP 分支点，346～347
FDP/GAP 分支点，348～349
6-磷酸葡萄糖分支点，347～348
PPH 分支点，349～350
X5P＋CHR 分支点，349
组浓度控制系数
确定，344
由通量测量，341
在代谢网络中，339～341
组通量控制系数
从已表征的扰动，343～344
一致性检验与实验证实，359～360
实验确定，350～352
图形表示，361～362
中间代谢物连接，354～355
对于赖氨酸的生物合成，343
测量误差影响，364～365
由 3 个扰动，341～343
组织
代谢工程在体内组织代谢中的作用，7
组装反应
在细胞代谢中，12～13

其他

Aspergillus nidulans（*nidulans* 曲霉，巢曲霉）
PP 途径，24
ATP
在代谢网络模型中作为分支点，329～333，346～347
用于主动运输中的消耗，19～20
用于维持消耗，42
有机酸的影响，16～17
在大肠杆菌（*E. coli*）代谢中，202～204
生成反应的吉布斯自由能，382～383
在途径集成中，13
生产和消耗的平衡，60～61
ATP 酶
作为主动运输系统，19
F_0F_1-，质子输出，20
BTX 混合物，见苯-甲苯-二甲苯混合物
CCC，见浓度控制系数
CHR，见分支酸
C-mole 基准及得率计算，71
Delgado-Liao 方法扩展，398
DNA，见脱氧核糖核酸
ED 途径，见 Enter-Doudoroff 途径
Embden-Meyerhof-Parnas 途径
控制点，24～25
在糖酵解中，21
己糖激酶反应的非平衡热力学，385
中间物，23～25
反应，22
热力学可行性分析，374～377
EMP 途径，见 Embden-Meyerhof-Parnas 途径
Enter-Doudoroff 途径
在糖酵解中，21
反应，22
FCC，见通量控制系数
FDP，见 1,6 二磷酸果糖
GAP，见 3-磷酸甘油醛

Glc6P，见 6-磷酸葡萄糖
Hill 方程
  对别构酶的应用，97～98
lac 操纵子转录控制，99～101
Leloir 途径
  在糖酵解中，21～22
MATHCAD 程序用于矩阵运算，78
MATHEMATICA 程序用于矩阵运算，78
MATLAB 程序用于矩阵运算，78
MCA，见代谢控制系数
MFA，见代谢通量分析
Michaelis-Menten 反应
  饱和动力学，18～19
NAD^+
  由 NADH 氧化，390～391
NADH
  线粒体内膜通透性，29～30
  氧化为 NAD^+，390～391
  在途径集成中，12～13
  在细胞代谢中的作用，24～25
NADPH
  在途径集成中，12～13
  在细胞代谢中的作用，24～25
NMR，见核磁共振分析
Onsager 的倒数关系
  应用于细胞生长，393
  在非平衡热力学中，386
PEP，见磷酸烯醇丙酮酸
PEP 羧化酶，见磷酸烯醇丙酮酸羧化酶
Pho 调节子
  在大肠杆菌（*Escherichia coli*）中，106～107
PP 途径，见磷酸戊糖途径
PPC，见磷酸烯醇丙酮酸羧化酶
PPH
  在代谢网络模型中作为分支点，349～350
RNA，153
  反义 RNA 的功能
  聚合，38～41
RNA 聚合酶
  转录控制，98～101
Schwanniomyces occidentalis
  淀粉降解，134～135
SIMS 矩阵
  对于芳香族氨基酸生物合成，326～328
  对于独立途径识别，318～319
  在核心矩阵确定中，320～321
TCA 循环
  回补途径，30～32
  在细菌中，232
  同位素标记代谢物分布
    从标记的乙酸，221～222
    从标记的丙酮酸，216～221
  NADH 和 FADH2 生成，61～64
  和氧化磷酸化作用，28～30
  调节位点，28～29
UDP-葡萄糖
  在贮藏糖类合成中的 UDP-葡萄糖，37～38
X5P，见 5-磷酸核酮糖

内 容 提 要

代谢工程是一个新出现的多学科交叉领域，是应用于化学品、燃料、材料、医药及环境等领域中菌种改进的一种平台技术。最近的发展表明，它在植物、动物代谢工程乃至人体组织细胞的基因治疗及代谢分析方面有重要应用。该领域的新颖性在于分子生物技术与数学分析工具的集成，这有助于阐明基因修饰的代谢通量控制及靶标的合理选择。通过提供对细胞生物学的准确严密的描述，代谢工程也可大大促进功能基因组学研究的深入发展。代谢工程的主要目标是识别特定的遗传操作和环境条件的控制，以增强生物技术过程的产率及生产能力，或对细胞性质进行总体改进。

本书最主要的内容包括途径集成和把代谢通量作为细胞生理学的基本决定因素来考虑的重要性。代谢工程把数学的复杂性减到最小，并同时提供一些必要的补充说明作为不同数学运算的背景材料。书中描述了途径分析的计算工具，书后还附有专业术语词汇，这些都有利于生物化学、分子生物学、微生物学、生物化学工程、生物医学工程等方面的科学研究人员、教师、研究生及高年级本科生使用本书。

本书有如下主要特点：

- 用途径分析的大量实例证明示范代谢工程正在起着日益重要的作用；
- 包括识别代谢网络中关键酶的方法；
- 提供了代谢生物化学的全面综述；
- 在基因、酶、操纵子和细胞水平讨论代谢调控；
- 清楚解释代谢途径化学计量学、动力学和热力学的基本概念；
- 使数学复杂性减小到最小；
- 可通过网络交流更新有关代谢工程的软件及讨论课后作业。

收到期 2004.5.17
来源 中关村图书大厦
书价 37.05
单据号 0665453
开票日期 2004.5.13.

中科院植物所图书馆
S0003509

000027831

58.1761
616

2003.
代谢工程--原理与方法

借者单位	借者姓名	借出日期	还书日期
[illegible]	2004.5.28	2004年6月30日	
[illegible]	04.08.31	2004年9月10日	
[illegible]	2004.12.13	2004年12月21日	

58.1761
616

000027831

国外名校名著　译著版系列

Chemical Process Design
Robin Smith 著　　王保国等译

Environmental Regulation and Impact Assessment
Leonard Ortolano 著　　郭怀成等译

Metabolic Engineering—Principles and Methodologies
Gregory N. Stephanopoulos 著　　赵学明 白冬梅等译

Industrial Water Pollution Control (3rd Ed.)
W. Wesley Eckenfelder, Jr. 著　　陈忠明等译

Air Pollution Control Engineering (2nd Ed.)
Noel De Nevers 著　　胡敏等译

Bioprocess Engineering—Basic Concepts (2nd Ed.)
Michael L. Shuler 著　　赵学明等译

Chemical Process Safety—Fundamentals with Applications (2nd Ed.)
Daniel A. Crowl 著　　蒋军成等译

Environmental, Safety, and Health Engineering
Gayle Woodside 著　　毛海峰等译

Transport Phenomena (2nd Ed.)
R. Byron Bird 著　　戴干策等译

Organic Chemistry—Structure and Function (4th Ed.)
K. Peter C. Vollhardt 著　　戴立信等译

Optimization of Chemical Processes (2nd Ed.)
Thomas F. Edgar 著　　张卫东等译

ISBN 7-5025-4568-9
9 787502 545680 >

ISBN 7-5025-4568-9/G·1237　定价：39.00元